

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 00/07211

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
IPC 7 C12N15/31 C12N9/14 C12P41/00 C12Q1/34

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N C12P C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	LUTZ-WAHL SABINE ET AL: "Stereo- and regioselective hydroxylation of alpha-ionone by Streptomyces strains." APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, vol. 64, no. 10, October 1998 (1998-10), pages 3878-3881, XP000946739 ISSN: 0099-2240 the whole document	4
X	ZOCHER FRANK ET AL: "A colorimetric assay suitable for screening epoxide hydrolase activity." ANALYTICA CHIMICA ACTA, vol. 391, no. 3, 4 June 1999 (1999-06-04), pages 345-351, XP000946717 ISSN: 0003-2670 the whole document	7-12

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

### \* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

3 October 2000

Date of mailing of the international search report

27. 10. 00

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Smalt, R



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 00/07211

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WEIJERS CAREL A G M ET AL: "Epoxide hydrolases from yeast and other sources: versatile tools in biocatalysis." JOURNAL OF MOLECULAR CATALYSIS B ENZYMATIC, vol. 6, no. 3, 11 March 1998 (1998-03-11), pages 199-214, XP000946716 ISSN: 1381-1177 the whole document	
P,X	--- ZOCHER F ET AL: "Epoxide hydrolase activity of Streptomyces strains" JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY,NL,ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, vol. 77, no. 2-3, February 2000 (2000-02), pages 287-292, XP004185827 ISSN: 0168-1656 the whole document -----	1-15



**FURTHER INFORMATION PCT/ISA/210**

The International Searching Authority found that this International Application contains several inventions or groups of inventions, as follows:

1. Claims Nos.: 1-6, 13, 14 completely, and claim partially

Epoxide hydrolases from a microorganism of the genus *Streptomyces*, the use thereof for the separation of epoxide-enantiomer mixtures, the strain Tü4 of *Streptomyces antibioticus* from which a hydrolase can be isolated, and a method for obtaining epoxide hydrolases from a culture of a microorganism of the genus *Streptomyces*.

2. Claims Nos.: 7-12 completely, and claim 15 partially

Method for screening epoxide hydrolase according to which an epoxide-containing substrate is incubated together with an analyte and the non-reacted epoxide is detected with 4-nitrobenzyl pyridine (NBP) by color reaction. Use of said method for detecting microorganisms that have epoxide hydrolase activity, and method for obtaining epoxide hydrolases from a *Streptomyces* culture using said screening method.



PCT

WORLD INTELLECTUAL PROPERTY ORGANIZATION  
International Bureau



INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

<b>(51) International Patent Classification <sup>6</sup> :</b> <b>C12N 15/55, 1/20, 1/21, 9/14, C12P 7/18, 7/22, 41/00, C12N 15/70</b>		<b>A1</b>	<b>(11) International Publication Number:</b> <b>WO 98/53081</b>
			<b>(43) International Publication Date:</b> 26 November 1998 (26.11.98)
<b>(21) International Application Number:</b> PCT/NL98/00290 <b>(22) International Filing Date:</b> 20 May 1998 (20.05.98)  <b>(30) Priority Data:</b> 97201515.0 21 May 1997 (21.05.97) EP <b>(34) Countries for which the regional or international application was filed:</b> NL et al.  <b>(71) Applicant (for all designated States except US):</b> RIJKSUNIVERSITEIT TE GRONINGEN [NL/NL]; Broerstraat 5, NL-9712 CP Groningen (NL).  <b>(72) Inventors; and</b> <b>(75) Inventors/Applicants (for US only):</b> LUTJE SPELBERG, Jeffrey Harald [NL/NL]; Aquamarijnstraat 49, NL-9743 PA Groningen (NL). RINK, Rick [NL/NL]; Stadhouderslaan 27a, NL-9717 AG Groningen (NL). KELLOGG, Richard, Morrison [NL/NL]; Lutsborgsweg 40, NL-9752 VW Haren (NL). JANSSEN, Dick, Barend [NL/NL]; Jachtlaan 24, NL-9301 KP Roden (NL).  <b>(74) Agent:</b> SMULDERS, Th., A., H., J.; Vereenigde Octrooibureaux, Nieuwe Parklaan 97, NL-2587 BN The Hague (NL).			<b>(81) Designated States:</b> AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, GM, GW, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).  <b>Published</b> <i>With international search report.</i> <i>Before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of the receipt of amendments.</i>
<b>(54) Title:</b> ENANTIOSELECTIVE EPOXIDE HYDROLASES AND GENES ENCODING THESE			
<b>(57) Abstract</b>  The invention is directed to an isolated microorganism capable of selectively degrading epichlorohydrin or related halopropanol compounds, said microorganism being a representative of <i>Agrobacterium spp</i> and comprising a nucleic acid molecule encoding a polypeptide having enantioselective epoxide hydrolase activity.			

**FOR THE PURPOSES OF INFORMATION ONLY**

Codes used to identify States party to the PCT on the front pages of pamphlets publishing international applications under the PCT.

AL	Albania	ES	Spain	LS	Lesotho	SI	Slovenia
AM	Armenia	FI	Finland	LT	Lithuania	SK	Slovakia
AT	Austria	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Senegal
AU	Australia	GA	Gabon	LV	Latvia	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaijan	GB	United Kingdom	MC	Monaco	TD	Chad
BA	Bosnia and Herzegovina	GE	Georgia	MD	Republic of Moldova	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tajikistan
BE	Belgium	GN	Guinea	MK	The former Yugoslav Republic of Macedonia	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Greece	ML	Mali	TR	Turkey
BG	Bulgaria	HU	Hungary	MN	Mongolia	TT	Trinidad and Tobago
BJ	Benin	IE	Ireland	MR	Mauritania	UA	Ukraine
BR	Brazil	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Iceland	MX	Mexico	US	United States of America
CA	Canada	IT	Italy	NE	Niger	UZ	Uzbekistan
CF	Central African Republic	JP	Japan	NL	Netherlands	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norway	YU	Yugoslavia
CH	Switzerland	KG	Kyrgyzstan	NZ	New Zealand	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Democratic People's Republic of Korea	PL	Poland		
CM	Cameroon	KR	Republic of Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kazakhstan	RO	Romania		
CU	Cuba	LC	Saint Lucia	RU	Russian Federation		
CZ	Czech Republic	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Germany	LK	Sri Lanka	SE	Sweden		
DK	Denmark	LR	Liberia	SG	Singapore		
EE	Estonia						



Title: Enantioselective epoxide hydrolases and genes encoding these.

The present invention relates to (microbial) epoxide hydrolases and biocatalytic reactions yielding optically pure epoxides and diols.

Optically active epoxides and 1,2-diols are important building blocks for the production of a range of optically active compounds that are needed for the production of pharmaceuticals and other fine chemicals. A number of strategies are available for the production of optically active epoxides (Schurig et al. 1992). An example that involves a catalytic asymmetric reaction is the Katsuki-Sharpless oxidation of unactivated double bonds, by means of an optically active titanium tartrate complex. A limitation is that the double bond must be in the allylic position relative to the hydroxyl group; this is necessary for coordination of the catalyst. Other procedures for the epoxidation of unfunctionalized prochiral alkenes have been developed using metalated salen- and porphyrin complexes as catalysts (Schurig et al. 1992). These methods have a low selectivity for terminal epoxides and limited applicability due to high catalyst cost and low turnover numbers. In general, the above methods cannot be applied economically on a large scale.

Biocatalytic reactions yielding optically pure epoxides have been described (Beetham et al. 1993; Faber et al, 1996). Lipases can be used for the resolution of racemic esters of epoxyalcohols to produce both enantiomers of the epoxyalcohol. Similarly, lipases may be used for the stereoselective resolution of esters formed from haloalcohols and a carboxylic acid. By trans-esterification, enantiomerically pure alcohols can be obtained, which may be converted to epoxides.

Biocatalytic production of epoxides is also possible by using mono-oxygenases. These enzymes require an unsaturated substrate and molecular oxygen. Reducing cosubstrates are required, and in general whole cells must be used to make regeneration of the cofactor economically feasible. Haloperoxidase based routes are also known. Haloperoxidases may produce optically active haloalcohols from alkenes.

Enzymatic kinetic resolution is a possible technique for the production of optically active epoxides. Enzymes that hydrolyse epoxides are called epoxide hydrolases. They convert epoxides to diols by cleaving the epoxide ring with water. Epoxide hydrolases have been detected in mammals, insects, yeasts, fungi, other eukaryotic organisms, and in prokaryotic organisms.

The epoxide hydrolases from higher eukaryotic organisms play a role in endogeneous metabolism and do not show strong substrate selectivity. They convert a variety of compounds formed from drugs by oxidative enzymes such as cytochrome P450. The sequence similarity of some epoxide hydrolases to dehalogenases (Beetham et al. 1995, Arand et al. 1994) suggests that they may act by covalent catalysis via a mechanism that does not allow racemisation (Lacourciere et al., 1993; Pries et al., 1994). The epoxide ring is opened by a nucleophilic attack of a carboxylate residue, yielding a covalent ester intermediate. Subsequently this intermediate is hydrolysed and the diol is released.

Production of epoxide hydrolases by eukaryotic organisms is well known. Most work has been done with crude microsomal preparations of liver tissue from rats or other mammals (Wistuba et al. 1992). Mammalian epoxide hydrolases have been studied in detail because epoxides are important in toxicology and in chemical carcinogenesis (Guengerich,

1982). However, the enzymes from mammals, which are known to be stereoselective in some cases, are difficult to obtain and serve multiple functions in vivo.

Styrene oxides are well investigated substrates for  
5 microsomal epoxide hydrolases. They have been used in a standard assay for determination of the activity of the enzyme. Styrene oxides with substituents on the ring were investigated for studies on the mechanism of this enzyme (Dansette et al. 1978). Further research showed that the  
10 microsomal epoxide hydrolase was able to hydrolyse enantioselectively styrene oxide (Watabe et al. 1983). The time course of this enzymatic hydrolysis showed a biphasic shape. At first the (R)-enantiomer is hydrolysed. After 90% conversion of the (R)-enantiomer, the (S)-enantiomer is  
15 hydrolysed at a much faster rate. This behaviour was explained by the fact that the (R)-enantiomer with a smaller  $K_m$  could inhibit the hydrolysis of the faster reacting (S)-enantiomer (higher  $K_m$ , higher  $V_{max}$ ). The enantioselective hydrolysis with mEH was also investigated  
20 with p-nitro styrene oxide (Westkaemper et al. 1980) and  $\beta$ -alkyl substituted styrene oxides (Belluci et al 1993 and 1996). Fungal or yeast enzymes are also known and used experimentally. These also are likely to serve detoxification functions or are involved in endogeneous  
25 metabolism and are also not very selective. Recently, epoxide hydrolases from *Aspergillus niger* have been used to resolve successfully styrene oxide (Chen et al. 1993) and para substituted styrene oxides such as p-nitro styrene oxide and p-chloro styrene oxide with high  
30 enantioselectivity towards the S-enantiomer (Nelliah et al. 1996, Pedragosa-Moreau et al 1996). Another fungus, *Beauveria sulfurescens*, showed high R-selectivity for styrene oxide.

However, production in prokaryotic expression systems of substantial amounts of the epoxide hydrolases that originate from eukaryotes has shown not to be practically feasible. Although many of the above enzymes can be studied experimentally, none of them is available for industrial biocatalytic application. Typical industrial processes which would benefit, however, from the availability of well defined epoxide hydrolases would be the preparation of enantiopure epoxides and 1,2-diols as for example is useful in the production of pheromones and vitamins. Bacterial epoxide hydrolases have been detected in epichlorohydrin-degraders (Nakamura et al. 1994, Jacobs et al. 1991), in organisms that degrade epoxysuccinic acid (Hand et al. 1969), and in organisms that convert nitrils (Hechtberger et al. 1993). The bacterial epoxide hydrolases probably serve a function in the metabolism of endogenous compounds or epoxides produced by monooxygenases, and their selectivity is not considered high. In a recent review on microbial epoxide hydrolases (Faber et al, 1996) it was observed that epoxide hydrolases could amply been found in eukaryotic cells but were rare in prokaryotic cells. However, in some isolates from bacterial genera such as *Corynebacterium*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Mycobacterium* and *Rhodococcus* epoxide hydrolase activity has been observed. Faber et al also described that epoxide hydrolase activity could be induced in only a limited number of bacterial isolates, notably in *Rhodococcus spp* and in *Mycobacterium*, whereas isolates from *Corynebacterium* and *Pseudomonas spp* did not show any epoxide hydrolase activity and epoxide hydrolase could not be induced by growing these latter species on a selective medium. In addition, Faber et al remark that, although prokaryotic epoxide hydrolases have some advantages above eukaryotic epoxide hydrolases, the enantioselectivities of microbial hydrolases (expressed as

enantiomeric ratio (ee)) are low and highly substrate dependent. Faber further remarks, that only a few microbial strains possessing suitable epoxide hydrolase activity for a given substrate are known and prediction of suitable microbial strains is not yet possible, until, for example, the three-dimensional X-ray structure of an epoxide hydrolase has been solved.

The present invention now surprisingly provides isolated micro-organisms that express epoxide hydrolases with a high enantioselectivity. Said micro-organisms represented and provided for by the invention can selectively degrade epichlorohydrin or related halopropanol compounds and their genome encodes a polypeptide having a highly enantioselective epoxide hydrolase activity.

The isolated micro-organism which is the representative micro-organism provided by the invention is *Agrobacterium spp* exhibiting high enantioselectivity. The micro-organisms provided by the invention essentially correspond to the micro-organism represented by *Agrobacterium radiobacter* deposited under deposit number CBS 750.97. The terms "essentially correspond" or "essentially corresponding" refer to variations that occur in nature and to artificial variations of representative micro-organisms which can selectively degrade epichlorohydrin or related halopropanol compounds and are having enantioselective epoxide hydrolase activity. In particular said variations relate to variations in the epoxide hydrolase and functional fragments thereof which can be isolated from said micro-organisms and to variations in the genome of said organisms encoding epoxide hydrolase and functional fragments thereof. In particular, the terms "essentially correspond" or "essentially corresponding" relate to those variations that still allow detection of epoxide hydrolase or functional fragments thereof in tests

for epoxide hydrolase activity or detection of the genome (be it DNA or RNA) or fragments thereof encoding epoxide hydrolase or functional fragments thereof by hybridization techniques, (such as nucleic acid blotting or *in situ* hybridization) or amplification techniques (such as PCR).

The invention also provides a pure culture of the micro-organism, and a (lyophilized) preparation thereof. The invention also provides a crude or pure enzyme preparation derived from said micro-organism, preparing and purifying enzymes from micro-organisms comprise ordinary skills known in the art. In addition, the invention provides (partly) purified epoxide hydrolase. The enzyme provided by the invention has a molecular weight of 30-40 kD as determined by SDS-polyacrylamide electrophoresis and contains 280-350 amino acids. Epoxide hydrolase as provided by the invention is generally water soluble, generally stable in Tris buffer at neutral pH and is generally able to convert epoxides with a broad specificity. It catalyses the conversion by covalent catalysis, using a nucleophilic aspartate.

The invention now also provides the isolated gene (a recombinant DNA molecule) or parts thereof encoding at least a functional part of a polypeptide having epoxide hydrolase activity. Such genes or fragments thereof can for example be derived from micro-organisms essentially corresponding to those that can selectively degrade epichlorohydrin or related halopropanol compounds.

Furthermore, the invention provides a recombinant DNA molecule encoding a polypeptide exhibiting enantioselective epoxide hydrolase activity. In figure 1, the coding nucleic acid sequence of the gene encoding the epoxide hydrolase of *Agrobacterium radiobacter* (deposit number CBS 750.97) is shown.

Furthermore, the invention provides genetically modified epoxide hydrolases with altered epoxide hydrolase activity. Modification is now possible because the functional catalytic site is known. The catalytic site comprises at least the amino acid residues at or around positions 107, 246 and/or 275 of the sequence shown in figure 1. The invention provides genomically related epoxide hydrolase in which at least one codon is mutated to encode for an amino acid providing the gene product with a modified epoxide hydrolase activity. Modification is now also possible because the invention provides host cells (such as bacteria or yeast cells, but many host cells are known in the field) that can be transformed via recombinant technology to express epoxide hydrolases and modified versions thereof, and functional fragments thereof. Such host cells can for instance be transformed with a vector comprising a recombinant DNA molecule encoding epoxide hydrolase activity derived from representative micro-organisms that can selectively degrade epichlorohydrin or related halopropanol compounds and which genome encodes a polypeptide having a highly enantioselective epoxide hydrolase activity.

Now that epoxide hydrolase can be produced via recombinant DNA technology, it is possible to obtain it in large quantities in a pure form. This enables for the first time crystallisation of epoxide hydrolase and resolution of its three-dimensional structure, allowing further prediction of microbial strains possessing suitable epoxide hydrolase activity for a given substrate, and allowing further selection of epoxide hydrolases with various selective specificities.

The invention also provides a method of stereoselectively converting racemic mixtures of optically active epoxides to diols, using an epoxide hydrolase

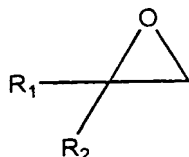
obtained from a micro-organism or host cell provided by the invention. The intermediate- and end-products of this conversion are enantiomerically pure epoxides and/or enantiomerically pure diols that can easily be extracted from the reaction mixture by suitable extraction methods known in the art. In said method the reaction can be performed by a pure or semi-pure culture of the micro-organism or by a preparation thereof, or by a crude or pure enzyme preparation derived from said micro-organism or host cell, making industrial application of epoxide hydrolases as biocatalysts in a variety of reactions possible. Immobilized or free enzyme may be used. For immobilisation a wide range of techniques can be applied, for example the absorption of the isolated enzyme or the whole cells onto a water-insoluble macroscopic carrier. Some examples of carriers that can be used are Celite, cellulose, or ion exchange resins such as DEAE-cellulose or DEAE-Sephadex. Another technique is the covalent attachment on a macroscopic carrier such as porous glass or dextran. The isolated enzyme molecules can be crosslinked to each other using a crosslink molecule such as glutardialdehyde. The enzymes can also be entrapped into reversed micelles using an organic solvent and a detergent such as Aerosol OT.

The epoxide hydrolase activity of epichlorohydrin-degrading organisms can be used for the kinetic resolution of mixtures of stereo-isomers of various epoxides, such as styrene oxides or other epoxides containing an aromatic group. These epoxides are represented by the formula given in figure 2. An epoxide is allowed to react in the presence of the epoxide hydrolase. After a certain amount is converted, the reaction is stopped and the product is isolated.

The present invention is accordingly also embodied by the process for preparing enantiomerically enriched



epoxides and/or diols, comprising contacting a racemic epoxide of the formula



5 wherein R1 and R2 are independently selected from the group of hydrogen and organic radicals with an isolated micro-organism capable of selectively degrading epichlorohydrin or related halopropanol compounds, said micro-organism being a representative of *Agrobacterium spp* and comprising  
10 a nucleic acid molecule encoding a polypeptide having enantioselective epoxide hydrolase activity.

R1 and R2 are preferably selected from the group of hydrogen and, optionally substituted, straight or branched alkyl, alkenyl, aryl, aralkyl, alkaryl groups.

15 An enzyme preparation is obtained from the epichlorohydrin-degrading micro-organism *Agrobacterium radiobacter* or from a recombinant bacterium that expresses an epoxide hydrolase gene obtained from an epichlorohydrin-degrading micro-organism. The epoxide hydrolase gene was  
20 cloned by means of the polymerase chain reaction. Based on the N-terminal and C-terminal amino acid sequence, two degenerate primers were designed. Chromosomal DNA was amplified and the resulting 900 bp PCR product was translationally fused in the NcoI-(startcodon)-site of  
25 pGEF+, resulting in pEH20. The gene is under control of the strong T7 promotor and typically 100-200 mg of purified epoxide hydrolase can be obtained from one liter of culture of *E.coli* BL21. The f1 origin of replication makes it a suitable mutagenesis and sequence vector. The epoxide  
30 hydrolase is produced by growing a host cell in a fermentor under conditions which cause expression. Both constitutive

production or induced production of the enzyme is possible. Alternatively, the DNA encoding for the epoxide hydrolase of an epichlorohydrin degrading bacterium is cloned into an expression vector by PCR amplification and cloning of the amplified DNA or by cloning of restriction enzyme fragments. The cloned DNA is expressed by induction or by stimulating expression of a specific polymerase. Subsequently, the epoxide hydrolase is produced under standard conditions.

The epoxide hydrolase is remarkably similar to haloalkane dehalogenase from *Xanthobacter autotrophicus* GJ10, both in structure and reaction mechanism. Based on homology, we classify this enzyme as an  $\alpha/\beta$  hydrolase fold enzyme. The catalytic triad residues (Asp<sup>107</sup> -His<sup>275</sup> -Asp<sup>246</sup>) are identified by sequence similarity and by mutation. Further it is shown that the reaction mechanisms of epoxide hydrolase proceeds via a covalently bound ester intermediate. The three dimensional structures of bromoperoxidase A2 and haloalkane dehalogenase are solved and their structural elements are displayed in the sequence alignment in figure 3. Also the consensus of four secondary structure prediction programs for epoxide hydrolase is shown. Clearly, the predicted structural elements of the main domain coincide. The sequence alignment shows that the catalytic residues of bromoperoxidase A2 and haloalkane dehalogenase are also conserved in epoxide hydrolase (marked by D and H)

The plot in figure 4 shows the topology of the  $\alpha/\beta$ -hydrolase fold of bromoperoxidase A2 and haloalkane dehalogenase. The main domain consists out of a central  $\beta$ -sheet surrounded by  $\alpha$ -helices. The cap domain is formed out of  $\alpha$ -helices and is specific for each enzyme. The catalytic triad residues, the nucleophile (D107), histidine (H275), and the acid residue (D246) occupy preserved positions in the topology.

Sequence similarity studies pointed out the residues Asp107, His275, and Asp246 as the catalytic residues of epoxide hydrolase, i.e. the functional part thereof. Mutants were constructed to support this hypothesis. All  
5 mutant enzymes were expressed in crude extract as soluble enzyme and in quantities comparable to wild type epoxide hydrolase. Steady state activities were determined in crude extract. Asp107Ala, Asp107Glu, His275Arg and His275Glu mutants were not catalytically active, only the Asp246Ala  
10 mutant had residual activity left.

Single turnover experiments with the mutant His275Arg enzyme and epichlorohydrin which were quenched after different reaction times showed that epichlorohydrin disappeared within seconds without the formation of  
15 product. We conclude that the diol formed from epichlorohydrin is covalently bound to the enzyme.

The reaction that we postulate but that in no way can be seen as limiting the invention for epoxide hydrolase is as follows. Asp<sup>107</sup> performs a nucleophilic attack on the  
20 primary carbon atom of the epoxide ring. Incorporation of <sup>18</sup>O labelled water occurs only at the primary carbon atom. A water molecule that is activated by His<sup>275</sup> attacks the carbonyl function of Asp<sup>107</sup>, and product is released. Asp<sup>246</sup> has a charge relay function. In analogy with Trp<sup>125</sup> in  
25 haloalkane dehalogenase, Phe<sup>108</sup> could be involved in substrate binding. We also expect the presence of a proton donor group, located in the cap domain.

In conclusion, the epoxide hydrolase of *Agrobacterium* spp. belongs to the class of  $\alpha/\beta$ -hydrolase  
30 folded enzymes. The displayed sequence similarity, the structural features (secondary structure prediction and circular dichroism), the inactive active site mutants, and the existence of an ester intermediate are all in agreement.

35 It is now possible to study the kinetics of epoxide hydrolase by performing rapid quench and stopped flow

experiments. Stopped flow experiments are possible since substrate is able to quench the fluorescence signal of some of the tryptophans present in epoxide hydrolase.

Also, it is possible to mutate (replace) the amino acids (e.g. tryptophans) that are involved in substrate binding. Either with site-directed mutagenesis or random mutagenesis, it is possible to modify the substrate specificity and the stereoselectivity of epoxide hydrolase. The epoxide hydrolase has the following characteristics.

- 34 kDa monomeric enzyme (approximately 294 amino acids)
- high expression in *E. coli* and stable at 4°C for at least half a year
- epoxide hydrolase contains considerable amounts of  $\alpha$ -helical and  $\beta$ -stranded structure as is demonstrated by Circular Dichroism
- epichlorohydrin is a suitable substrate ( $V_{\max} = 25 \mu\text{mol min}^{-1}.\text{mg}.\text{protein}^{-1}$ ,  $K_m < 30 \mu\text{M}$ )

Its DNA sequence is shown in figure 1. It is generally soluble, generally stable in Tris buffer at neutral pH and is able to convert several epoxides with a broad specificity. The epoxide hydrolase is isolated and used directly or stored as a lyophilised preparation. For lyophilization, the enzyme is dialysed against a suitable buffer. Immobilised or free enzyme may be used.

The asymmetric hydrolysis of the substrate is generally conducted in aqueous solution. The pH of the solution is maintained by means of a buffer. Maximum enzyme activity is obtained at pH 9 but a range of pH 5 to 11 can be employed. The composition of the buffer can for example be Tris/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, potassium phosphate or glycine/NaOH. The maximum enzyme activity is obtained at a temperature of 50°C, but the reaction can be conducted at a temperature ranging from 5°C to 65°C. The substrate concentration used to measure the enzyme activity is from 1 to 20 mM. In case

of poorly soluble substrates, the water solubility can be increased by adding a miscible organic cosolvent such a DMSO. Also other organic solvents can be used. Generally a higher cosolvent concentration increases the maximum solubility of the substrate, but it must not be so high as to inactivate the enzyme. The epoxide can also be introduced as a second phase. This can either be done by dissolving the epoxide in a non-miscible organic solvent such as octane or the epoxide itself can be added, as a liquid or a solid. This is then brought into contact with an aqueous phase containing the enzyme and the two phases are subsequently vigorously mixed. After completion of the reaction, the epoxide can easily be recovered or obtained from the organic solvent.

In a typical experiment, the substrate is dissolved in a quantity of buffer, with or without cosolvent, to a concentration of 1 mM to 250 mM. The lyophilised enzyme preparation is dissolved in a small quantity of buffer and is allowed to stabilise for some time. The enzyme solution is subsequently mixed with the buffer solution. The reaction is monitored by analysis of the degree of conversion of the epoxide or by appearance of the product of the conversion, the diol. This is determined by sampling a part of the reaction liquid and extracting it with an appropriate organic solvent. For the extraction of the epoxides diethyl ether can for example be used and for the diol ethylacetate can for example be used.

The enantiomeric composition of the epoxides is determined by a gaschromatography using a chiral column such as CP-cyclodextrin-b2,3,6-M19. Using the epoxide hydrolase, a large number of epoxides containing an aromatic group can be isolated in enantiomerically pure form by degrading the unwanted enantiomer. This can be done for e.g. styrene oxide, p-methylstyrene oxide,

x-methylstyrene oxide, fenylglycidyl ether, and glycidyl tosylate (figure 5). The enantiomerically pure product may be used for the synthesis of various other optically active compounds.

5

### Example 1

The production of styrene oxide with recombinant epoxide hydrolase *Agrobacterium radiobacter* strain AD1 expressed in *E.coli*. The epoxide hydrolase gene was cloned by means of PCR by using degenerate primers that were designed on the amino acid sequence of the N-terminus and the C-terminus that was known from publication in literature. Total DNA of *Agrobacterium radiobacter* strain AD1 was isolated from cells cultivated on 1,3-chloro-2-propanol using standard procedures. The gene of interest was amplified and cloned in an expression vector behind a T7-promotor of a plasmid such as pGEF, and brought to expressioin in *E.coli*. The recombinant enzyme was produced by fermentation. The whole cells were subsequently lyophilised or a crude cell-free extract was prepared by ultrasonic disruption and cetrifugation of the cells followed by a purification step with an anion exchange column. Finally the extract was dialysed against a Tris-buffer, lyophilised and stored at 4°C.

Prior to use the lyophilised cell-free extract (0.50 mg) was suspended in Tris buffer (pH 9.0, 50 mM, 0.5 ml). A flask containing a solution of 5 mM styrene oxide in Tris buffer (pH 9.0, 50 mM, 20 ml) was incubated at 30°C and the previously prepared enzyme solution was added. After 50 minutes the reaction was stopped and the remaining styrene oxide was extracted with diethyl ether. The enantiomeric purity of the styrene oxide was extracted with diethyl ether. The enantiomeric purity of the styrene oxide was determined by chiral gas chromatography on a  $\beta$ -cyclodextrin phase (CD-

cyclodextrin-b-2,3,6-M-19) at 95°C. The remaining (S)-enantiomer of the styrene oxide had an e.e. of 99% and a yield of 65%.

5           **Example 2**

          An amount of the lyophilised cell-free extract (4.5 mg) was suspended in Tris buffer (pH 9.0, 50 mM, 1 ml). A flask containing a solution of 5 mM phenyl glycidyl ether in Tris buffer (pH 9.0, 50 mM, 100 ml) was incubated at 30°C  
10   and the prepared enzyme solution was added. After 15 minutes the reaction was stopped and the remaining epoxide was extracted with diethyl ether. The enantiomeric purity of the remaining (R)-enantiomer was determined by chiral gas chromatography using a cyclodextrin column. The remaining  
15   (R)-enantiomer of the phenyl glycidyl ether had an e.e. > 99% and a yield of 55%.

**Example 3**

          An amount of the lyophilised cell-free extract (0.7 mg) was suspended in Tris buffer (pH 9.0, 50 mM, 1 ml).  
20   A flask containing a solution of 5 mM para-chlorostyrene oxide in Tris buffer containing 10% DMSO (pH 9.0, 50 mM, 20 ml) was incubated at 30°C and the prepared enzyme solution was added. After 15 minutes the reaction was stopped and the  
25   remaining para-chlorostyrene oxide was extracted with diethyl ether. The remaining (S)-enantiomer of the para-chlorostyrene oxide had an e.e. > 99% and a yield of 67%.

**Example 4**

30        An amount of the lyophilised whole recombinant cells (5 mg) was suspended in Tris buffer (pH 9.0, 50 mM, 1 ml). A flask containing a solution of 5 mM styrene oxide in Tris buffer (pH 9.0, 50 mM, 100 ml) was incubated at 30°C and the prepared whole cell suspension was added. After 65 minutes  
35   the reaction was stopped and the remaining styrene oxide was

extracted with diethyl ether. The remaining (S)-enantiomer of the styrene oxide had an e.e. of 99% and a yield of 56%.

#### Example 5

5        An amount of the lyophilised cell-free extract (100 mg) was suspended in Tris buffer (pH 9.0, 50 mM, 10 ml). A flask containing a solution of 50 mM styrene oxide in Tris buffer with 20% (v/v) DMSO (pH 9.0, 50 mM, 1000 ml) was incubated at 30°C and the prepared enzyme solution was added.  
10    After 125 minutes the reaction was stopped and the remaining styrene oxide was extracted with diethyl ether. The remaining (S)-styrene oxide had an e.e. > 99% and a yield of 60%.

#### Example 6

15        An amount of the lyophilised cell-free extract (25 mg) was suspended in Tris buffer (pH 9.0, 50 mM, 1 ml). A flask containing a solution of 5 mM glycidyl tosylate in Tris buffer with 10% (v/v) DMSO (pH 9.0, 50 mM, 100 ml) was incubated at 30°C and the prepared enzyme solution was added.  
20    After 20 minutes the reaction was stopped and the remaining epoxide was extracted with diethyl ether. The remaining (R)-enantiomer of the glycidyl tosylate had an e.e. > 99% and an analytical yield of 45%.

25

#### Figure legends

##### Figure 1

Complete DNA and amino acid sequence of the epichlorohydrin epoxide hydrolase gene *echA* from *Agrobacterium radiobacter*  
30    deposited at the Centraalbureau voor Schimmelcultures under number CBS 750.97. The residues shown at amino acid position 107, 246 and 275 comprise catalytic residues of epoxide hydrolase.

35



## Figure 2

Substrate for epoxide hydrolase I, wherein  $X_1$  is represented by II, III, IV or V and  $X_2$ ,  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$ ,  $R_4$  and  $R_5$  are independent from each other so that single as well as multiple substituents can be applied. These can be for example a hydrogen atom, a halogen atom, a nitro group, an alkyl group, a hydroxyl group, or a cyanide group. The length of the aliphatic chain can be  $n=0,1,2$  or 3 and  $m=1,2$  or 3.

10

## Figure 3

Sequence alignment of EchA with other hydrolases. The sequences were aligned using the multiple alignment program ClustalW and are shown in order of sequence similarity to the epoxide hydrolase cloned in this study. Six conserved amino acids are marked with #, four or five conserved residues are marked with +. The nucleophile is marked by N, the catalytic histidine by H, and the catalytic acid residue by A. Below the sequence alignment, the predicted secondary structure elements of EchA, and the determined secondary structures of Dh1A and BpA2 are shown.  $\beta$ -Strands are shown as arrows (numbered as for Dh1A) and  $\alpha$ -helices are shown as waves. Sequences: EchA, epoxide hydrolase from *A. radiobacter* strain AD1; DehH1, fluoroacetic acid dehalogenase from *Moraxella* sp. strain B; sEHs, soluble epoxide hydrolase from potato; sEHh, soluble epoxide hydrolase from human; BpA2, bromoperoxidase A2 from *Streptomyces aereofaciens*; Dh1A, haloalkane dehalogenase from *Xanthobacter autotrophicus* GJ10 and mEHh, microsomal epoxide hydrolase from human.

30

## Figure 4

Topology of the  $\alpha/\beta$  hydrolase fold of epoxide hydrolase from *Agrobacterium radiobacter*. Arrows indicate  $\beta$ -strands,

boxes indicate  $\alpha$ -helices. The numbers printed in large font indicate  $\beta$ -strands, those in small font indicate the residue numbers according to the amino acid sequence. The positions of the three catalytic triad residues is indicated.

Figure 5

Kinetic resolution of aromatic epoxides by epoxide  
hydrolase from *Agrobacterium radiobacter*

- 10 a) determined by injection of optically pure compound  
b) determined by optical rotation  
c) in 10% DMSO.

## References

- Arand M., Grant D.F., Beetham J.K., Friedberg T., Oesch F., Hammock B.D. (1994). *FEBS Lett.* 338, 251-256.
- 5 Archer, I.V.J. (1997), *Tetrahedron*, 53, 15617-15662
- Beetham J. K., Grant D., Arand M., Garbarino J., Kiyosue T., Pinot F., Oesch F., Belknap W. R., Shinozaki K., Bont, J. A. M. de. (1993) *Tetr. Asymm.* 6, 1331-1340.
- Watabe, T., Ozawa, N., Hiratsuka, A. (1983) *Biochem. Pharm.*
- 10 32, 777-785
- Chen, X. J., Archelas, A., Furstoss, R. (1993) *J. Org. Chem.* 58, 5528-5532, and 5533-5536.
- Nelliah, H., Morisseau, C., Archelas, A, Furstoss, R, Baratti, J. C. (1996) *Biotech. Bioeng.* 49, 70-77.
- 15 Nakamura, T, Nagasawa, T, Yu, F., Watanabe, I., Yamada, H. (1994) *Appl. Environ. Microbiol.* 12, 4630-4633
- Pedragosa-Moreau, S., Morisseau, C., Zylber, J., Archelas, A., Baratti, J., Furstoss, R. (1996) *J. Org. chem.* 61, 7402-7407
- 20 Guengerich, F. P. (1982) *Rev. Biochem. Toxicol.* 4, 5-30.
- Beetham, K. B., Grant, D., Arand, M., Garbarino, J., Kiyosue, T., Pinot, F., Oesch, F., Belknap, W.R., Shinozaki, K., Hammock B.D. (1995) *DNA Cell Biol* 14, 61-71.
- Hechtberger, P., Wirnsberger, G., Mischitz, M., Klempier, N., Faber, K. (1993). *Tetr. Asymm.* 4, 1161-1164.
- 25 Jacobs, M. H. J., A. J. van den Wijngaard, M. Pentenga, D. B. Janssen. (1991). *Eur. J. Biochem.* 202, 1217-1222.
- Lacourciere, G. M., Armstrong, R. N. (1993) *J. Am. Chem. Soc.* 115, 10466-10467.
- 30 Hand, R. H., Jakoby, W .B. (1969) *J. Biol. Chem.* 244, 2078-2084.

- Pinot, F., Grant, D. F., Beetham, J. K., Parker, A. G.,  
Borhan, B., Landt, S., Jones, A. D., Hammock B. D. (1995)  
*J Biol Chem* 270, 7968-7974.
- Pries, F., Kingma, J., Pentenga, M., van Pouderooyen, G.,  
5 Jeronimus-Stratingh, C. M., Bruins, A. P., Janssen. D. B.  
(1994) *Biochemistry* 23, 1242-1247.
- Dansette, P. M., Makedonska, V. B., Jerina, D. M. (1978)  
*Arch. Biochem. Biophys.* 2, 290-298.
- Westkamper, R. B., Hanzlik, R. P. (1981) *Arch. Biochem.*  
10 *Biophys.* 208, 195-204.
- Schurig, V., Betschinger, F. (1992) *Chem. Rev.* 92, 873-888.  
Swaving J. et al. 1994. *Biocatalysis* 10, 227-232.)
- Wistuba, D., Schurig, V. (1992). *Chirality* 4, 178-184.
- Belluci, G., Chiappe, C., Cordoni A., Marioni, F. (1993)  
15 *Tetr. Asymm.* 4, 1153-1160.
- Belluci, G., Chiappe, C., Cordoni A. (1996) 7, 197-202.
- Faber et al., *actu.chem.Scand.*(1996) 50, 249-258

## CLAIMS

1. An isolated micro-organism capable of selectively degrading epichlorohydrin or related halopropanol compounds, said micro-organism being a representative of *Agrobacterium spp* and comprising a nucleic acid molecule  
5 encoding a polypeptide having enantioselective epoxide hydrolase activity.
2. A micro-organism according to claim 1, said micro-organism essentially corresponding to the micro-organism *Agrobacterium radiobacter* deposited May 7, 1997 at  
10 Centraalbureau voor Schimmelcultures under deposit number CBS 750.97.
3. A pure culture, or a preparation thereof, of a micro-organism according to claim 1 or 2.
4. A crude or pure enzyme preparation, comprising a  
15 polypeptide or functional fragments thereof, having epoxide hydrolase activity, said polypeptide derived from a micro-organism according to claim 1 or 2.
5. A polypeptide or functional fragments thereof, having epoxide hydrolase activity, said polypeptide (fragment)  
20 derived from a micro-organism according to claim 1 or 2.
6. A polypeptide having enantioselective epoxide hydrolase activity, said polypeptide having a catalytic mechanism based on a catalytic triad formed by two aspartate and one histidine groups, preferably as defined in figure 1.
- 25 7. A polypeptide according to claim 5 or 6, having an amino acid sequence that corresponds for at least 90% to the sequence of figure 1.
8. A recombinant DNA molecule comprising a nucleotide sequence encoding at least a functional part of a  
30 polypeptide having epoxide hydrolase activity.

9. A recombinant DNA molecule according to claim 8, wherein said polypeptide exhibits enantioselective activity.
10. A recombinant DNA molecule according to claim 8 or 9, said nucleotide sequence being derived from a micro-  
5 organism according to claim 1 or 2.
11. A recombinant DNA molecule comprising at least a functional part of the sequence of figure 1, preferably at least 90%, and coding for a polypeptide having epoxide hydrolase activity.
- 10 12. A recombinant DNA molecule according to claim 11 wherein said polypeptide exhibits enantioselective activity.
13. A recombinant DNA molecule according to any of claims 9 to 12 wherein at least one codon is mutated to encode for  
15 an amino acid providing the gene product with a modified epoxide hydrolase activity.
14. A vector for expression of a polypeptide (fragment) having epoxide hydrolase activity in a host cell comprising a recombinant DNA molecule according to any one of claims  
20 7-13.
15. A host cell for expression of a polypeptide (fragment) having epoxide hydrolase activity comprising a vector according to claim 14.
16. A host cell according to claim 15 which is a bacterium  
25 or a yeast cell.
17. A method for producing a polypeptide (fragment) having epoxide hydrolase activity comprising the use of a micro organism according to claim 1 or 23, or a host cell according to claim 15 or 16.
- 30 18. A pure culture, or a preparation thereof, of a host cell according to any claims 15 or 16.
19. A crude or pure enzyme preparation, comprising a polypeptide or functional fragments thereof, having epoxide

hydrolase activity, said polypeptide derived from a host cell according to claim 15 or 16.

20. A polypeptide (fragment) having epoxide hydrolase activity obtainable by a method according to claim 17.

5 21. A polypeptide (fragment) according to claim 20, wherein said polypeptide exhibits enantioselective activity.

22. Use of a polypeptide (fragment) according to claim 5, 20, or 21 to stereoselectively convert racemic mixtures of optically active epoxides to diols.

10 23. Use of a micro-organism according to claim 1 or 2, or a host cell according to claim 15 or 16, or a culture, or preparation thereof, according to claims 3 or 16 or a enzyme preparation according to claims 4 or 19 to fully of partly and stereoselectively convert racemic mixtures of  
15 optically active epoxides to diols.

24. Use according to claims 22 or 23 to prepare enantiopure epoxides and diols.

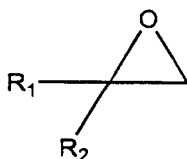
25. Process for the enzymatic hydrolysis of epoxides, said process comprising contacting a racemic epoxide with a  
20 polypeptide according to claim 5, 13 or 21 and/or a micro-organism according to claim 1 or 2, or a host cell according to claim 15 or 16, or a culture, or preparation thereof, according to claims 3 or 18 or a enzyme preparation according to claims 4 or 19 to fully of partly  
25 and stereoselectively convert racemic mixtures of optically active epoxides to diols.

26. Process for the preparation of substantially pure optically active epoxides and/or diols by stereospecifically hydrolysing a racemic mixture of  
30 epoxides using a broadly specific microbial epoxide hydrolase yielding preparations of optically active epoxides or diols with at least 95% e.e.

27. Process for the preparation of substantially pure optically active epoxides and/or diols by

stereospecifically hydrolysing a racemic mixture of epoxides using a microbial epoxide hydrolase yielding preparations of optically active epoxides with at least 99% e.e.

- 5 28. Process for preparing enantiomerically enriched epoxides and/or diols, comprising contacting a racemic epoxide of the formula



- 10 wherein R1 and R2 are independently selected from the group of hydrogen and organic radicals with an isolated micro-organism capable of selectively degrading epichlorohydrin or related halopropanol compounds, said micro-organism being a representative of *Agrobacterium* spp and comprising  
15 a nucleic acid molecule encoding a polypeptide having enantioselective epoxide hydrolase activity.
29. Process according to claim 28, wherein R1 and R2 are selected from the group of hydrogen and, optionally substituted, straight or branched alkyl, alkenyl, aryl,  
20 aralkyl, alkaryl groups.



atgactatcagaagacccgaagactttaaacactacgaagtgcagttaccagacgtgaaa 60  
M T I R R P E D F K H Y E V Q L P D V K 20

atccactacgtccgcgagggagcgggtccgacactggtgctggtgcacggctggccccggg 120  
I H Y V R E G A G P T L L L L H G W P G 40

ttctggtgggagtgaggcaaggtcataggcccgctcgcagagcactacgatgtcattggt 180  
F W W E W S K V I G P L A E H Y D V I V 60

cccgacctgcgcggcttcggtgactccgaaaagccggacttaaacgacttgtccaagtac 240  
P D L R G F G D S E K P D L N D L S K Y 80

tcgctcgacaaagcggccgacgaccaagcagcccttctcgacgcactagggattgaaaag 300  
S L D K A A D D Q A A L L D A L G I E K 100

gcgtacgtcgttggccatgacttcgcgggccatcgctcctccataaattcattcgaaagtac 360  
A Y V V G H D F A A I V L H K F I R K Y 120

agcgatcgagtcacaaagcagcgatctttgatcctatccagcccgactttgggcccggtc 420  
S D R V I K A A I F D P I Q P D F G P V 140

tacttcggcttggggcacgtccacgagtcgtggtactcgcaattccatcaactagatatg 480  
Y F G L G H V H E S W Y S Q F H Q L D M 160

gccgttgaggtcggtgggctcgagtcgcgaggtgtgcaagaagtacttcaaacacttcttc 540  
A V E V V G S S R E V C K K Y F K H F F 180

Fig. 1

gatcactgggtcataccgggatgagttgctcactgaggaagaacttgagggttcacgtcgat 600  
D H W S Y R D E L L T E E E L E V H V D 200

aactgtatgaagcctgacaacattcacggaggcttcaactactatcgtgccaacataagg 660  
N C M K P D N I H G G F N Y Y R A N I R 220

cccgatgccgctctgtggacagacctcgatcatacgatgagcgaccttccagtaacaatg 720  
P D A A L W T D L D H T M S D L P V T M 240

atatgggggtttgggagatacttgcgtagccctatgctccactcattgaattcgttcctaag 780  
I W G L G D T C V P Y A P L I E F V P K 260

tactattcgaactatacgatggagacgatcgaagactgcggtcacttcttgatgggtcgaa 840  
Y Y S N Y T M E T I E D C G H F L M V E 280

aaacctgaaattgccatcgatcgaatcaaaaccgcgttccgctga 885  
K P E I A I D R I K T A F R - 294

Fig. 1 continued

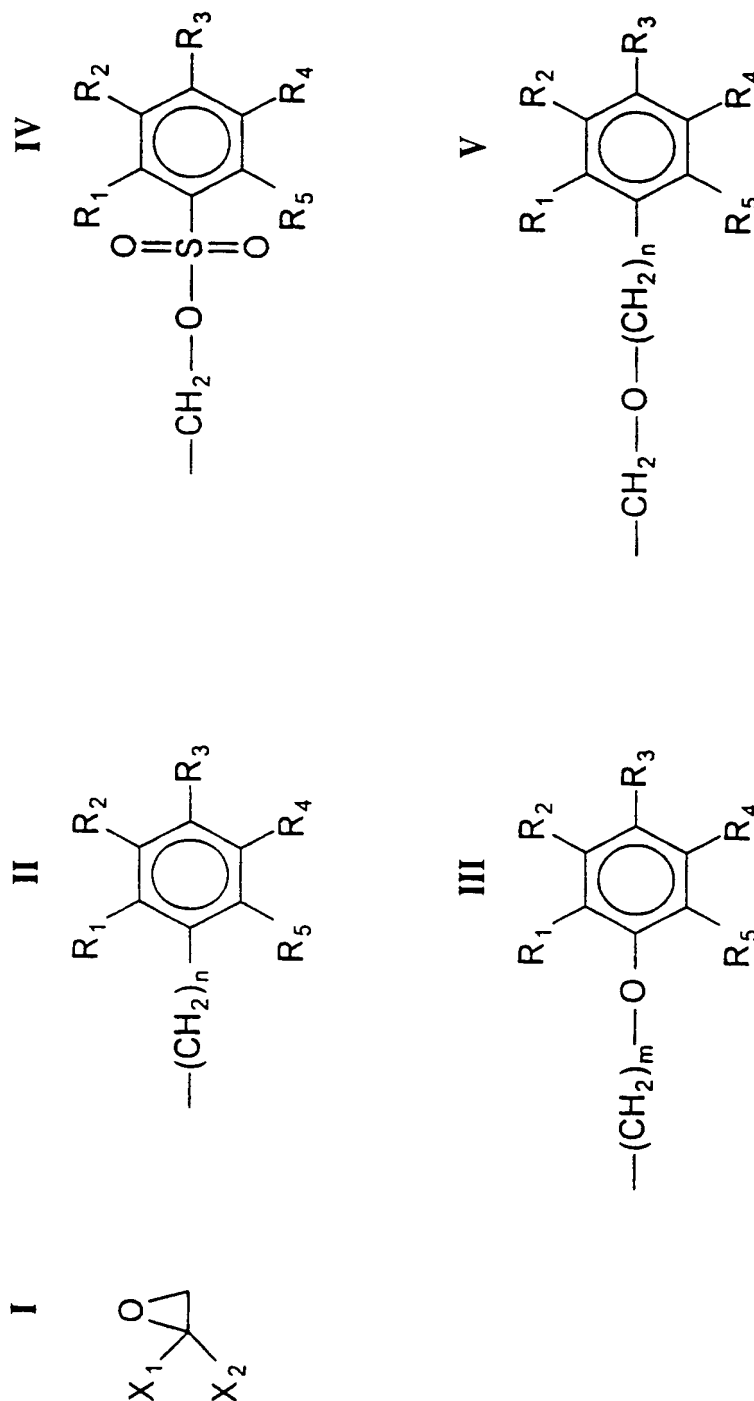
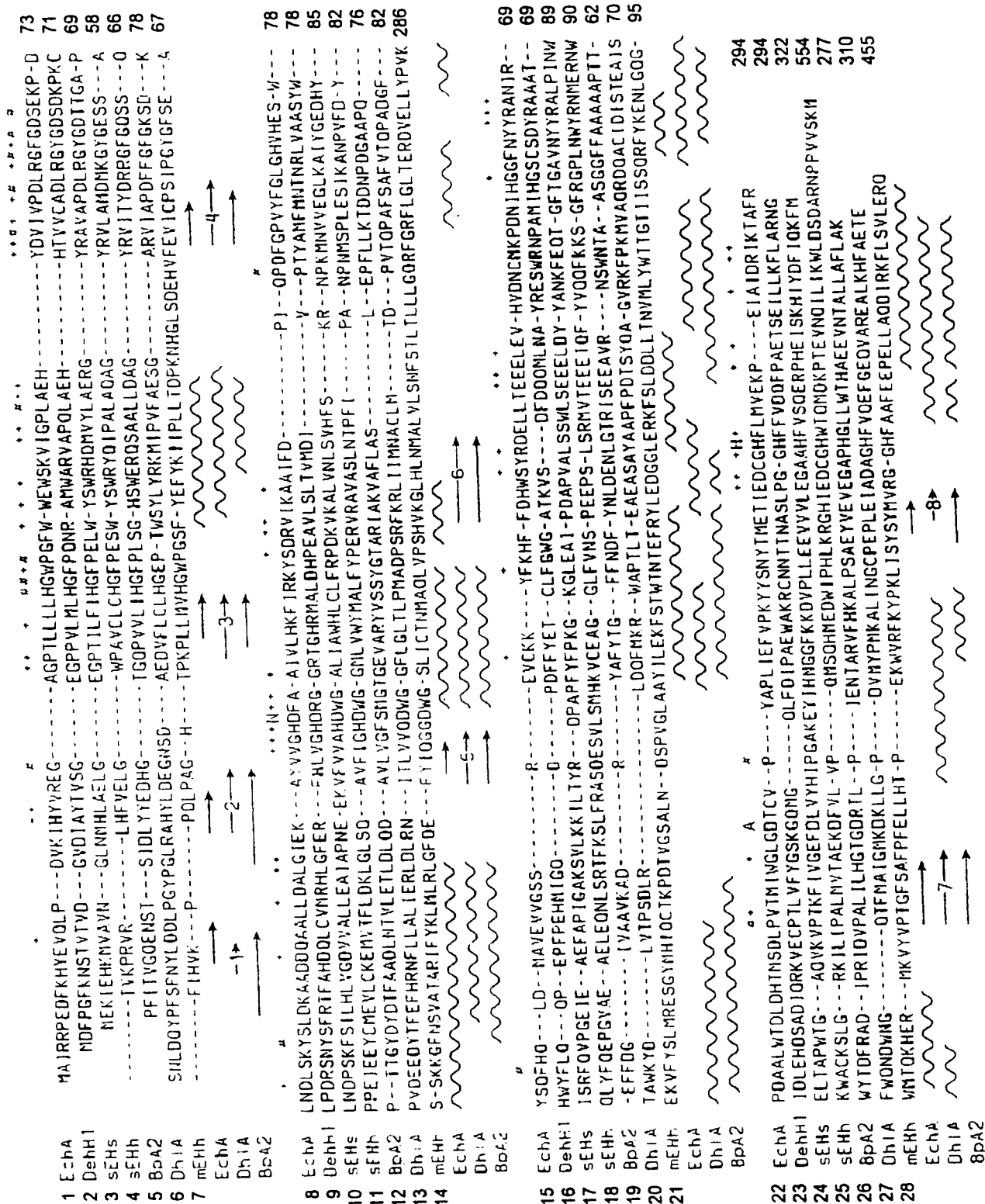


Fig. 2

Fig. 3



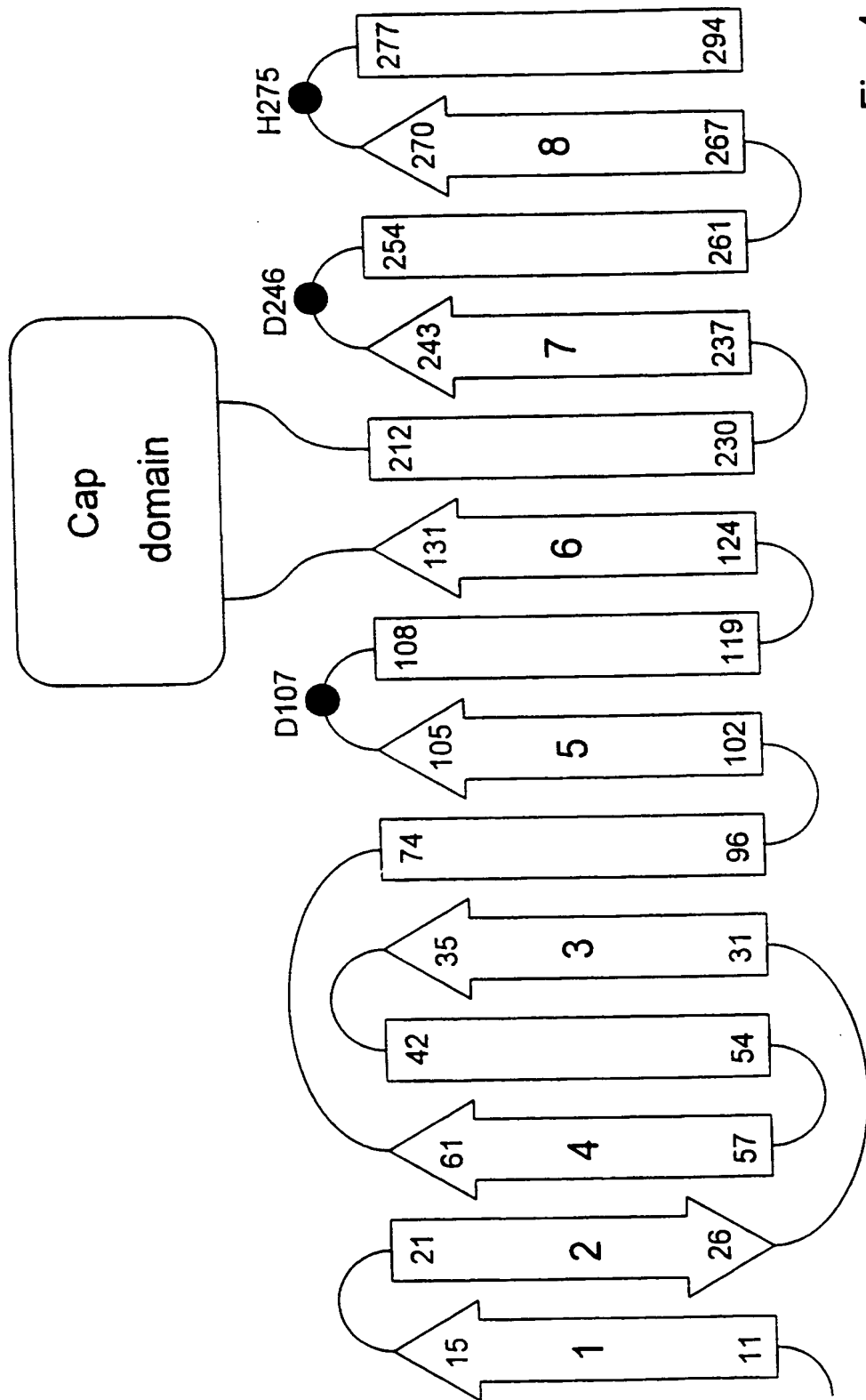
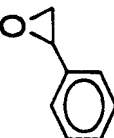
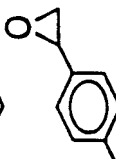
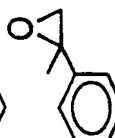
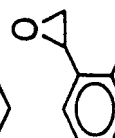

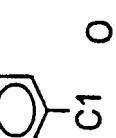
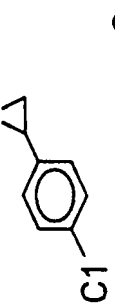


Fig. 4

Fig. 5

EPOXIDE	%E.E	YIELD(%) OF THE REMAINING ENANTIOMER	ABS. CONF.
	99	65	(S) <sup>a</sup>
	>99 <sup>c</sup>	72	(S) <sup>b</sup>
	>99	54	(?) <sup>b</sup>
	>99 <sup>c</sup>	70	(+) <sup>b</sup>
	>99 <sup>c</sup>	54	(S) <sup>a</sup>
	>99 <sup>c</sup>	67	(S) <sup>b</sup>
	99	55	(R) <sup>b</sup>

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

NL 98/00290

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C12N15/55 C12N1/20 C12N1/21 C12N9/14 C12P7/18  
C12P7/22 C12P41/00 C12N15/70

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12N C12P C12R

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	MISCHITZ, M. ET AL: "Asymmetric microbial hydrolysis of epoxides" TETRAHEDRON: ASYMMETRY (1995), 6(6), 1261-72 CODEN: TASYE3; ISSN: 0957-4166, XP004048169 see the whole document --- -/--	1,3-5, 17-27

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

### \* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

22 September 1998

Date of mailing of the international search report

29/09/1998

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Delanghe, L

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

NL 98/00290

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 111, no. 15, 9 October 1989 Columbus, Ohio, US; abstract no. 130494, VAN DEN WIJNGAARD, ARJAN J. ET AL: "Degradation of epichlorohydrin and halohydrins by bacterial cultures isolated from freshwater sediment" XP002045873 see abstract & J. GEN. MICROBIOL. (1989), 135(8), 2199-208 CODEN: JGMIAN;ISSN: 0022-1287,	1
A	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 116, no. 9, 2 March 1992 Columbus, Ohio, US; abstract no. 79047, JACOBS, M. ET AL.: "Characterization of the epoxide hydrolase from an epichlorohydrin-degrading Pseudomonas sp." page 362; XP002045874 see abstract & EUR.J.BIOCHEM., vol. 202, no. 3, 1991, pages 1217-1222,	1
A	PEDRAGOSA-MOREAU, S. ET AL: "Microbiological transformations. 33. Fungal epoxide hydrolases applied to the synthesis of enantiopure para-substituted styrene oxides. A mechanistic approach" J. ORG. CHEM. (1996), 61(21), 7402-7407 CODEN: JOCEAH;ISSN: 0022-3263, XP002045872 see the whole document	1
A	NL 8 700 468 A (RIJKSLANDBOUWHOGESCHOOL) 16 September 1988 see claims	1
A	US 5 445 956 A (HAMMOCK BRUCE D ET AL) 29 August 1995 see claims	1
A	WO 96 12818 A (MERCK & CO INC) 2 May 1996 see claims	1



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

national Application No

NL 98/00290

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
NL 8700468	A	16-09-1988	NONE	
US 5445956	A	29-08-1995	NONE	
WO 9612818	A	02-05-1996	CA 2203016 A EP 0784698 A JP 10507636 T	02-05-1996 23-07-1997 28-07-1998



(12) NACH DEM VEREIN ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
1. Februar 2001 (01.02.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
**WO 01/07623 A1**

(51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: C12N 15/31,  
9/14, C12P 41/00, C12Q 1/34

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP00/07211

(22) Internationales Anmeldedatum:  
26. Juli 2000 (26.07.2000)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:  
199 35 113.9 27. Juli 1999 (27.07.1999) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme  
von US): BASF AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE];  
D-67056 Ludwigshafen (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): ZOCHER, Frank  
[DE/DE]; Allmandring 31, D-70569 Stuttgart (DE).  
ENZELBERGER, Markus [DE/DE]; Allmandring 31,

D-70569 Stuttgart (DE). SCHMID, Rolf, D. [DE/DE];  
Allmandring 31, D-70569 Stuttgart (DE). WOHLLEBEN,  
Wolfgang [DE/DE]; Schwabstrasse 14, D-72076 Tübingen  
(DE). HAUER, Bernhard [DE/DE]; Merowingerstrasse  
1, D-67056 Fussgönheim (DE).

(74) Anwälte: KINZEBACH, Werner usw.; Reitstötter,  
Kinzebach & Partner, Sternwartstrasse 4, D-81679  
München (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (national): AU, CA, CN, JP, NO,  
US.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): europäisches Patent (AT,  
BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC,  
NL, PT, SE).

Veröffentlicht:

— Mit internationalem Recherchenbericht.

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen  
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on  
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe  
der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: EPOXIDE HYDROLASES FROM STREPTOMYCES

(54) Bezeichnung: EPOXIDHYDROLASEN AUS STREPTOMYCES

(57) Abstract: The invention relates to epoxide hydrolases from bacteria of the genus *Streptomyces* sp., to a novel method for the enzymatic separation of epoxide-enantiomer mixtures, to a novel assay method for epoxide hydrolase activity, to a screening method for detecting epoxide hydrolase activity and to the use of bacteria of the genus *Streptomyces* sp. and the epoxide hydrolases obtained from them for an enantio-selective epoxide hydrolysis.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft Epoxidhydrolasen aus Bakterien der Gattung *Streptomyces* sp., ein neues Verfahren zur enzymatischen Trennung von Epoxid-Enantiomergemischen, ein neuartiges Nachweisverfahren für Epoxidhydrolaseaktivität, ein Screening-Verfahren zum Nachweis von Epoxidhydrolaseaktivität und die Verwendung von Bakterien der Gattung *Streptomyces* sp. und der daraus gewonnenen Epoxidhydrolasen zur enantioselektiven Epoxidhydrolyse.

WO 01/07623 A1



## Epoxidhydrolasen aus Streptomyces

### Beschreibung

5

Die Erfindung betrifft verbesserte Epoxidhydrolasen, welche aus Bakterien der Gattung Streptomyces sp. isolierbar sind, ein neues Verfahren zur enzymatischen Trennung von Epoxid-Enantiomergemischen, ein neuartiges Nachweisverfahren für Epoxidhydrolaseaktivität, ein Screening-Verfahren zum Nachweis von Epoxidhydrolaseaktivität und die Verwendung von Bakterien der Gattung Streptomyces sp. und der daraus gewonnenen Epoxidhydrolasen zur enantioselektiven Epoxidhydrolyse.

15

Die zunehmende Bedeutung enantiomerenreiner Verbindungen vor allem in der pharmazeutischen und der agrochemischen Industrie erfordert einen sicheren und wirtschaftlichen Zugang zu optisch aktiven Substanzen. Für die Darstellung von enantiomerenreinen Diolen und Epoxiden steht eine Reihe von Methoden zur Verfügung:

Bei der asymmetrischen chemischen Synthese von Epoxiden geht man von einer prochiralen Verbindung aus. Durch Verwendung eines chiralen Reagens, beispielsweise einer chiralen Persäure, eines chiralen Dioxirans bzw. Oxaziridins oder eines chiralen Borats, eines chiralen Auxiliars oder eines chiralen, metallischen oder nicht-metallischen, Katalysators wird ein chirales Epoxid gebildet. Der bekannteste Weg zur Darstellung chiraler Epoxide ist die Sharpless-Epoxidierung von Alkenolen, z.B. von Allylalkoholen, mit Hydroperoxiden in Gegenwart von Übergangsmetallkatalysatoren.

Auch die Herstellung von enantiomerenreinen Diolen auf biochemischem Weg ist bekannt. Mikroorganismen mit Epoxidhydrolaseaktivität katalysieren die regio- und enantiospezifische Hydrolyse von Epoxiden. Sie spalten die Etherbindung in Epoxiden unter Bildung von Diolen. Es wurden bereits einige Bakterienstämme beschrieben, die es ermöglichen, eine breite Auswahl an racemischen Epoxiden enantioselektiv zu hydrolysieren. Die Zahl der bekannten Epoxidhydrolasen und ihre Anwendung für die organische Synthese ist jedoch bislang begrenzt. Bekannte Stämme mit Epoxidhydrolaseaktivität sind beispielsweise Aspergillus niger LCP521, Bacillus sulfurescens ATCC 7159, Rhodococcus species NCIMB 11216 und andere.

Die bekannten Stämme mit Epoxidhydrolaseaktivität weisen jedoch oft ein begrenztes Substratspektrum und geringe Reaktionsgeschwindigkeiten auf. Auch sind die mit diesen Stämmen erreichbaren Enantioselektivitäten vielfach zu gering [Grogan, G., et al.,

- FEMS Microbiology Lett. 141 (1996), 239 - 243; Kroutil, W., et al., Tetrahedron Lett. (1996), 8379 - 8382]. Die bekannten Stämme sind genetisch schlecht zugänglich und teilweise schwierig kultivierbar. Deshalb liegen bisher nur zwei Epoxidhydrolasen [Corynebacterium sp. C12, (Misawa, E., et al., Eur. J. Biochem. 253 (1998), 173 - 183) und Agrobacterium radiobacter AD1 (Rink, R., et al., J.Biol.Chem. 272 (1997), 14650 - 14657)] rekombinant in E.coli vor. Auch die Reinigung der aus den Mikroorganismen erhaltenen Epoxidhydrolasen wurde bisher nur bei Rhodococcus species
- 10 NCIMB 11216 [Faber, K., et al., Biotechnology Lett. 17 (1995), 893 - 898] und Norcardia EH 1 [Kroutil, W., et al J. Biotechnol. 61 (1998), 143 - 150] beschrieben. Sie war in beiden Fällen sehr aufwendig. Die Anreicherung von Epoxidhydrolase aus Corynebacterium sp. C12 wird von Misawa, E., et al., Eur. J. Biochem.
- 15 253, (1998) 173-183 beschrieben.

Zusätzlich erschwert wird die Suche nach neuen epoxidhydrolasehaltigen Mikroorganismen dadurch, daß das Screening, d.h. die systematische Suche, nach neuen Epoxidhydrolase produzierenden Mikroorganismen, z.B. in mikrobiologischen Stammsammlungen, bisher sehr zeitaufwendig war. Dies liegt daran, daß zum Screening üblicherweise Verfahren eingesetzt werden, bei denen die einzelnen Ansätze aufgearbeitet und einzeln gas- bzw. flüssigkeitschromatographisch untersucht werden müssen.

- 25 Eine erste Aufgabe der Erfindung war es daher, neue Epoxidhydrolasen mit erweitertem Substratspektrum und/oder verbesserter Reaktivität und/oder verbesserter Enantioselektivität bereitzustellen. Außerdem sollten die neuen Epoxidhydrolasen insbesondere
- 30 dadurch besser zugänglich sein, daß sie aus nicht-pathogenen, leicht kultivierbaren Organismen isolierbar sind und außerdem gegebenenfalls eine gute molekularbiologische Zugänglichkeit aufweisen.

- 35 Eine zweite Aufgabe der Erfindung war die Bereitstellung eines Verfahrens zum schnelleren und einfacheren Nachweis von Epoxidhydrolase, was auch ein verbessertes Screening auf Epoxidhydrolase produzierende Mikroorganismen ermöglichen sollte.

- 40 Eine dritte Aufgabe der Erfindung war die Bereitstellung eines verbesserten biochemischen Verfahrens zur Trennung von Epoxid-Enantiomergemischen und damit eines verbesserten Verfahrens zur enantioselektiven Umsetzung von Epoxiden, das einen einfacheren Zugang zur enantiomerenreinen Diolen und/oder Epoxiden ermöglicht.
- 45 licht.

Eine vierte Aufgabe der Erfindung bestand darin, neue Epoxidhydrolase produzierende Mikroorganismen bereitzustellen.

Überraschenderweise wurde obige erste Aufgabe gelöst durch Bereitstellung von Epoxidhydrolasen (E.C. 3.3.2.3) aus Mikroorganismen der Gattung *Streptomyces* sp. Epoxidhydrolase-Aktivität wurde in Mikroorganismen dieser Gattung bisher nicht beschrieben.

Die erfindungsgemäßen Epoxidhydrolasen besitzen wenigstens eine der folgenden vorteilhaften Eigenschaften im Vergleich zu bisher bekannten Epoxidhydrolasen:

- verbesserte Enantioselektivität bei der Spaltung von enantiomerer Epoxide;
- 15 - verbessertes (erweitertes) Substratspektrum;
- verbesserte Reaktivität;
- bessere molekularbiologische Zugänglichkeit;
- bessere biochemische Zugänglichkeit aufgrund leichter Kultivierbarkeit der Mikroorganismen.

20

Eine "verbesserte Enantioselektivität" im Sinne der Erfindung ist gegeben, wenn bei im wesentlichen gleichem Umsatz ein höherer Enantiomerenüberschuß erzielbar ist.

25 Ein "erweitertes Substratspektrum" in Sinne der Erfindung bedeutet, daß racemische Gemische mehrerer Epoxide umgesetzt werden.

Eine "verbesserte Reaktivität" im Sinne der Erfindung bedeutet, daß die Umsetzung mit höherer Raum-Zeit-Ausbeute erfolgt.

30

Gegenstand der Erfindung sind insbesondere solche Epoxidhydrolasen aus *Streptomyces*, die wenigstens eine der folgenden Eigenschaften aufweisen:

- 35 a) hydrolytische Epoxidspaltung eines Styroloxids, wie z.B. Styroloxid oder eines am Phenylring oder Epoxidring ein- oder mehrfach substituierten Derivats davon, wie insbesondere einem in meta- oder para-Stellung durch Nitro oder Halogen, insbesondere Chlor oder Brom, monosubstituierten Styroloxids, und wenigstens einer weiteren Verbindung ausgewählt unter 3-Phenyl-ethylglycidat, n-Hexan-1,2-oxid, n-Decan-1,2-oxid und Indenoxid, welche gegebenenfalls ein- oder mehrfach durch Substituenten, vorzugsweise gemäß obiger Definition, substituiert sein können;

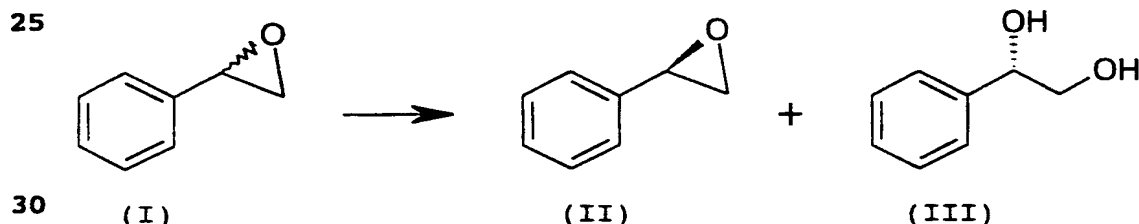
45

- b) Umsetzung eines Racemats von Styroloxid mit einer Enantio-  
 selektivität  $E \geq 2$ , wie z.B.  $\geq 10$ , wie etwa 10 bis 100, zu  
 (S)-Phenyl-1,2-ethanol gemäß der im folgenden angegebenen Re-  
 aktionsgleichung (A), wobei diese Umsetzung mit ganzen Zellen  
 5 oder einem Zellhomogenat oder einem angereicherten oder ge-  
 reinigten Enzympräparat durchführbar ist und bevorzugt in Ge-  
 genwart eines Cosolvens, wie 5 bis 10% (v/v) DMSO erfolgt.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform werden Epoxidhydrolasen  
 10 bereitgestellt, welche aus Bakterien der Gattung *Streptomyces*  
*sp.*, insbesondere aus der Art *S. griseus*, *S. thermovulgaris*, *S.*  
*antibioticus*, *S. arenae* und *S. fradiae*, vorzugsweise aus den  
 Stämmen *Streptomyces griseus* (DSM 40236 und DSM 13447), *Strepto-*  
*myces thermovulgaris* (DSM 40444 und DSM 13448), *Streptomyces are-*  
 15 *nae* Tü 495 (DSM 40737 und DSM 12134) *Streptomyces antibioticus* Tü 4  
 (DSM 12925) oder *Streptomyces fradiae* Tü 27 (DSM 12131) iso-  
 lierbar sind.

Besonders bevorzugt ist die aus *Streptomyces antibioticus* Tü 4  
 20 (DSM 12925) isolierbare Epoxidhydrolase. Dieses Enzym ist durch  
 seine ausgeprägte Enantioselektivität bei der Umsetzung von  
 (R/S)-Styroloxid (I) gemäß folgender Reaktionsgleichung (A)

Reaktionsgleichung (A):



zu (S)-Phenyl-1,2-ethandiol (III) unter Nicht-Hydrolyse von  
 (R)-Styroloxid (II) charakterisiert. So katalysiert dieses Enzym  
 in einem Reaktionsmedium, enthaltend 10 % (v/v) DMSO als Lösungs-  
 35 vermittler, obige Umsetzung unter einer Enantioselektivität von  $E$   
 $= 13$  und einem Enantiomerenüberschuß  $ee[\%] = 99$  für (II) und  
 $ee[\%] = 14$  für (III).

Die Isolierung des Enzyms wird in den Ausführungsbeispielen näher  
 40 beschrieben. Soweit keine näheren Angaben gemacht werden, erfolgt  
 die Enzym-Anreicherung mit Hilfe biochemischer Standardverfahren,  
 wie z.B. beschrieben von T.G. Cooper in *Biochemische Arbeitsme-*  
*thoden*, Verlag Walter de Gruyter, Berlin, New York, (1981). Bei-  
 spielsweise eignen sich Reinigungsverfahren, wie Fällung, z. B.  
 45 mit Ammoniumsulfat, Ionenaustauschchromatographie, Gelchromato-  
 graphie, Affinitätschromatographie, z. B. Immunoaffinitätschroma-



tographie und isoelektrische Fokussierung, sowie Kombinationen solcher Verfahren.

Gegenstand der Erfindung ist außerdem einen neuer Streptomyces-  
5 Stamm mit der Bezeichnung Streptomyces antibioticus Tü 4, hinterlegt bei der DSMZ unter der Hinterlegungsnummer DSM 12925 und Varianten und Mutanten dieses Stammes.

Gegenstand der Erfindung sind ebenfalls funktionale Analoga der  
10 erfindungsgemäß bereitgestellten Enzyme, wie Varianten, Allele und Mutanten, welche Epoxidhydrolase-Aktivität besitzen und, vorzugsweise, wenigstens eine der obengenannten vorteilhaften Eigenschaften aufweisen.

15 Obige zweite Aufgabe konnte überraschenderweise gelöst werden durch Bereitstellung eines optischen Nachweisverfahrens für Epoxidhydrolase, wobei man

- a) einen Analyten, z.B. eine Mikroorganismenkultur, in welchen  
20 man Epoxidhydrolaseaktivität vermutet, mit einem epoxidhaltigen Substrat für die Epoxidhydrolase unter Reaktionsbedingungen inkubiert;
- b) nicht umgesetztes Epoxid mit 4-Nitrobenzylpyridin (NBP) unter  
25 Bildung eines bei 560nm absorbierenden Farbstoffs chemisch umsetzt; und
- c) den Ansatz aus Schritt b) auf Abnahme der Farbstoffkonzentration, relativ zu einem Epoxidhydrolase-freien Kontrollansatz  
30 analysiert.

Das erfindungsgemäße Nachweisverfahren ist qualitativ, z.B. als Spottest, oder quantitativ durchführbar. Beim quantitativen Verfahren bestimmt man zunächst quantitativ die relative Abnahme der  
35 Farbstoffkonzentration, z.B. photometrisch durch Bestimmung der Absorption bei 560 nm, und ermittelt daraus die Epoxidhydrolaseaktivität im Analyten.

Als Analyt sind grundsätzlich geeignet Mikroorganismen per se,  
40 wie z.B. Proben aus einer frisch gezogenen Kultur eines Bakteriums, Zellhomogenisate davon oder Fraktionen dieser Zellhomogenisate nach einer Aufreinigung. Vorzugsweise wird der Test mit ganzen Zellen oder nach Aufschluß der Zellen, z.B. mit Ultraschall oder Lysozym, durchgeführt.

Beispielsweise ist das Verfahren anwendbar auf den Nachweis von Epoxidhydrolase in Bakterien aus der Gattung *Streptomyces*.

Vorzugsweise wird das Nachweisverfahren so durchgeführt, daß man einer frisch gezogenen Kultur des Mikroorganismus eine Probe entnimmt, diese aufschließt, von Zellfragmenten befreit und mit einem Epoxid, welches ein Substrat für das zu testende Enzym umfaßt, zugibt und mischt. Erforderlichenfalls kann man in dem Ansatz die Reaktionsbedingungen durch übliche Maßnahmen, wie z.B. durch Zugabe von Puffer, Einstellen der Reaktionstemperatur und dergleichen, optimieren. Bevorzugt verwendet man zur Verbesserung der Löslichkeit des Epoxids im wässrigen Reaktionsmedium ein Cosolvens. Geeignete Cosolventien sind z.B. Dimethylsulfoxid (DMSO), Dimethylformamid (DMF), Ethanol oder Aceton. Optimale Reaktionsbedingungen für Epoxidhydrolasen aus *Streptomyces* umfassen:

Reaktionsmedium: Natriumphosphatpuffer pH 8,0, 0,1 M, 10% (v/v) DMSO

20 pH-Bereich: 6-8  
Temperatur: 30-37 °C  
Reaktionsdauer: 2-20 Stunden  
Substrat-  
konzentration: 0,1 bis 0,8 molar

25

Vorzugsweise verwendet man als Substrat Styroloxid, 3-Phenylglycidat, Hexan-1,2-oxid, Decan-1,2-oxid und/oder Indenoxid in enantiomerenreiner Form oder als Enantiomerengemisch.

30 Zur Entwicklung der Farbreaktion wird anschließend der pH-Wert durch Zugabe einer Base, wie z.B. Triethylamin, eingestellt. Anschließend gibt man NBP, z.B. in einer Konzentration im Bereich von etwa 3 bis 10 , vorzugsweise etwa 5 % (w/v) in Methoxyethanol, hinzu. Als Lösungsvermittler für den gebildeten Farbstoff  
35 gibt man z.B. Triethylenglycoldimethylether in ausreichender Menge hinzu. Den Ansatz inkubiert man schließlich bei etwa 35 bis 45, vorzugsweise 39°C und bestimmt anschließend die Absorption bei 560 nm, vorzugsweise gegen eine Referenz bei 650 nm. Aus einem Vergleich mit einem enzymfreien Kontrollansatz kann man die Ab-  
40 nahme der Absorption und damit die Abnahme von Epoxid quantitativ bestimmen.

Gegenstand der Erfindung sind auch Screening-Verfahren zum Nachweis von Mikroorganismen mit Epoxidhydrolaseaktivität und/oder  
45 mit der Befähigung zur enantioselektiven Hydrolyse von Epoxiden, umfassend das oben beschriebene Nachweisverfahren. Dieses eignet sich besonders zur systematischen Untersuchung von Stammsammlun-

gen oder durch sog. "directed evolution" erzeugte Mutantenbanken auf Epoxidhydrolaseaktivität.

Obige dritte Aufgabe konnte überraschenderweise gelöst werden  
5 durch Bereitstellung eines Verfahrens zur Trennung von Epoxid-Enantiomerengemischen, das dadurch gekennzeichnet ist, daß man

- 10 a) ein Epoxid-Enantiomerengemisch, welches ein Epoxydhydrolase-Substrat umfasst, mit einer erfindungsgemäßen Epoxydhydrolase, einem Mikroorganismus der Gattung Streptomyces sp., einem Epoxidhydrolase-haltigen Homogenat davon oder einer Fraktion dieses Homogenates unter Reaktionsbedingungen inkubiert;
- 15 b) das Enantiomerengemisch, vorzugsweise bis zum Erreichen von 50 %-igem Umsatz, umgesetzt; und
- 20 c) das im Reaktionsgemisch verbleibende Enantiomer vom Umsetzungsprodukt trennt und das im wesentlichen enantiomerenreine Umsetzungsprodukt und/oder das verbleibende im wesentlichen enantiomerenreine Edukt reinigt.

Vorzugsweise setzt man Enantiomerengemische eines der folgenden Epoxide um: Styroloxid, 3-Phenylglycidat, He-xan-1,2-oxid, Decan-1,2-oxid und Indenoxid oder substituierte Analoga dieser  
25 Oxide gemäß obiger Definition.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft ein Verfahren zur Gewinnung von Epoxydhydrolasen (E.C. 3.3.2.3), dadurch gekennzeichnet, daß man

- 30 a) aus einer Kultur eines Mikroorganismus der Gattung Streptomyces sp. ein Zellhomogenat herstellt;
- b) das Homogenat fraktioniert, wobei man die erhaltenen Fraktionen auf Epoxidhydrolase-Aktivität, vorzugsweise unter Anwendung eines Nachweisverfahrens basierend auf der Farbreaktion von unumgesetztem Epoxid mit NBP gemäß obiger Definition, testet; und
- 35 c) Fraktionen mit Epoxidhydrolase-Aktivität vereinigt und gegebenenfalls weiter fraktioniert.

Ein letzter Gegenstand der Erfindung betrifft die Verwendung einer erfindungsgemäßen Epoxidhydrolase, eines Mikroorganismus der  
45 Gattung Streptomyces sp., eines Epoxidhydrolase-haltigen Homoge-

nates davon oder einer Fraktion dieses Homogenates zur enantioselektiven Hydrolyse von Epoxiden.

Die Erfindung wird durch die nachfolgenden Beispiele und unter Bezugnahme auf die beiliegenden Figuren näher erläutert. Dabei zeigt:

Figur 1 Meßergebnisse für die Farbstoffbildung aus NBP und Epoxid bei verschiedenen Styroloxidkonzentrationen. Aufgetragen ist die Absorptionsänderung in Ansätzen in Gegenwart von *E. coli* DH5a nach dem NBP-Assay (schwarze Kreise), ohne *E. coli* DH5a-Zelle und ohne NBP (schwarze Quadrate) und mit Zelllysate von *E. coli* DH5a nach NBP-Assay (schwarze Dreiecke), jeweils nach 45 Minuten bei den angegebenen Styroloxidkonzentrationen.

Figur 2 den zeitlichen Verlauf der Racematspaltung von Styroloxid durch die Epoxidhydrolase aus *S. antibioticus* Tü4 (DSM 12925). ee[%] (R)-Styroloxid (schwarze Quadrate); ee[%] (S)-Phenyl-1,2-ethandiol (schwarze Kreise); Umsatz[%] (schwarze Dreiecke);

Figur 3 den Einfluß verschiedener Cosolventien auf die Hydrolyse von Styroloxid durch Epoxidhydrolase aus *S. antibioticus* Tü4 (DSM 12925); aufgetragen ist ee[%] (R)-Styroloxid in Abhängigkeit von der Cosolvenskonzentration (%(v/v)); Aceton (schwarze Quadrate); DMSO (schwarze Kreise); DMF (schwarze Dreiecke).

Beispiel 1 : Validierung eines Testsystems für Epoxidhydrolase

a) Styroloxid als Substrat

Ein Epoxidhydrolase-freier Organismus (*E. coli* DH5a) wurden in 2 ml Kulturen kultiviert und aufgeschlossen. Jeweils 100 µl der erhaltenen Zellaufschlüsse wurden auf 4 Vertiefungen einer Mikrotiterplatte verteilt. Zu dem Zellaufschluß wurden 50 µl Aceton mit verschiedenen Styroloxidmengen (1,3 mol/l (Stammlösung), 0,65 mol/l, 0,32 mol/l, 0,16 mol/l, 0,08 mol/l) hinzugegeben. Die Lösung wurde 2 Stunden bei 30°C inkubiert. Nach Zugabe von 25 µl Triethylamin (TE), 50 µl p-Nitrobenzylpyridin (NBP, 5 Vol.-%) und 50 µl Triethylenglykoldimethylether wurde nochmals 45 Minuten bei 39°C inkubiert und anschließend die Absorption bei 560 nm gegen eine Referenz bei 650 nm gemessen.

Die Ergebnisse sind in Figur 1 dargestellt. Die Absorption nahm linear zur eingesetzten Styroloxidmenge zu. Deshalb zeigt die Verringerung der Absorption das Vorhandensein einer Epoxidhydro-laseaktivität an.

5

b) 3-Phenylglycidat als Substrat

Beispiel 1a) wurde mit der Abänderung wiederholt, daß als Substrat 3-Phenylglycidat verwendet wurde. Auch hier fand sich eine  
10 Linearität zwischen der Absorption und der verbleibenden Menge an nicht hydrolysiertem Epoxid.

c) Hexan-1,2-oxid als Substrat

15 Beispiel 1a) wurde mit der Abänderung wiederholt, daß als Substrat Hexan-1,2-oxid verwendet wurde. Auch hier fand sich eine Linearität zwischen der Absorption und der verbleibenden Menge an nicht hydrolysiertem Epoxid.

20 d) Indenoxid als Substrat

Beispiel 1a) wurde mit der Abänderung wiederholt, daß als Substrat Indenoxid verwendet wurde. Auch hier fand sich eine Linearität zwischen der Absorption und der verbleibenden Menge an  
25 nicht hydrolysiertem Epoxid.

Beispiel 2: Screening verschiedener Streptomyces-Stämme auf Epoxidhydrolase-Aktivität mit Styroloxid als Substrat

30 Analog zu Beispiel 1 wurden verschiedene hinterlegte Streptomyces-Stämme sowie als negative Kontrolle ein Bakterienstamm der Gattung Rhodococcus sp. (NCIMB 11216) getestet. Diejenigen Vertiefungen der Mikrotiterplatte welche die negative Kontrolle enthielten zeigten eine intensive Farbreaktion (Blaufärbung) während  
35 in Vertiefungen mit Streptomyces antibioticus Tü4 (DSM 12925) und Streptomyces fradiae Tü27 (DSM 12131) die höchste Epoxidhydro-lase-Aktivität nachweisbar war (Ergebnisse nicht gezeigt).

Beispiel 3: Kultivierung des Stammes Streptomyces antibioticus  
40 Tü4

Die Kultivierungen wurden sowohl in 250 ml Schüttelkolben als auch in einem 30 l Fermenter durchgeführt, wobei der pH-Wert nicht kontrolliert wurde.

45

- a) 250 ml Fermentation: Die Kultivierungsdauer betrug im 250 ml Maßstab zwischen 48 und 72 Stunden bei 30°C.
- b) 30 l Fermentation: 2 Schüttelkolben mit je 1 l Malzmedium [10 g Malzextrakt, 4 g Hefe, auf 1 l mit Leitungswasser aufgefüllt und autoklaviert, sterilfiltrierte Glucose (4g/l Endkonzentration) wurde nach dem Autoklavieren hinzugegeben] wurden mit Sporen von *Streptomyces antibioticus* Tü4 angeimpft; anschließend wurde 48 Stunden geschüttelt (30°C, 210 U/min). Mit 2 l dieser Vorkultur wurden 20 l Malzmedium (Zugabe von 0,5 l 20 gew.-%ige Glucoselösung zu 20 l Malzextrakt/Hefelösung) angeimpft, wobei sich für ein möglichst disperses Wachstum der Kolonie die vorherige Homogenisierung (Glashomogenisator, Braun Chemie) empfiehlt. Es wurde im 30 l-Fermenter bei 30°C 24 Stunden gerührt (17 l/min O<sub>2</sub>, 200 U/min), dann wurde die Fermentation abgebrochen. Die Zellen wurden bei 4000 U/min 30 Minuten abzentrifugiert und mit TE-Puffer (pH 7,3, 1 mmol/l EDTA) gewaschen. Die Biofeuchtmasse betrug 318 g. Die Zellen wurden in 400 ml TE-Puffer (pH 7,3, 1 mmol/l EDTA) resuspendiert.

Beispiel 4: Anreicherung Epoxidhydrolase aus *S. antibioticus* Tü4

25 a) Zellaufschluß:

Für die Versuche mit aufgeschlossenen Zellen wurden die kultivierten Zellen durch Filtration oder Zentrifugation abgetrennt und zweimal mit Phosphatpuffer (0,1 mol/l NaCl, 10 mmol/l EDTA) gewaschen. Anschließend wurde eine Suspension (10% w/v) im gleichen Puffer mit zusätzlich 10 mg/ml Lysozym hergestellt. Die Suspension wurde 1 Stunde bei 30°C inkubiert und anschließend zweimal je 5 Minuten, dazwischen 1 Minute Pause, im Eisbad mit Ultraschall aufgeschlossen (Branson Sonifier W250, Output 80W). Die erhaltene Lösung wurde 60 Minuten bei 32 500 x g abzentrifugiert und filtriert (0,22mm Sterivex-GP Filter, Millipore)

b) Aufarbeitung des Zellextraktes

40 Eine mit einem Anionenaustauscher gefüllte Säule (Super Q 650M, Toso Haas, 60 ml Volumen) wurde mit 25 ml Tris/HCl-Puffer (pH 8,1) äquilibriert, dann wurden 15 ml des Rohextraktes eingebracht. Es wurde mit 2 mol/l NaCl-Lösung mit folgenden Gradienten eluiert:

45

1. Gradient: 30 ml NaCl-Lösung (0 - 12 Gew.-% ),

2. Gradient: 60 ml NaCl-Lösung (12 - 35 Gew.-%),

Spülung mit 25 ml NaCl-Lösung (100 Gew.-%), Reäquilibrierung mit 60 ml Tris/HCl-Puffer.

5 Durchlauf: 4 ml/min, Fraktionsgröße 4 ml. Die Proteinbestimmung wurde bei 280 nm durchgeführt.

Die Aktivität der einzelnen Fraktionen wurde mit dem NBP-Assay  
10 untersucht. Hierzu wurden 150 µl aus den Fraktionen in die Vertiefungen einer 96er Mikrotiterplatte gegeben und der NBP-Assay mit dem Biomek 2000 Pipettierroboter wie zuvor beschrieben durchgeführt. Es wurden 50 µl Acetonlösung mit Styroloxid (2,6 mol/l) verwendet, um die Acetonmenge zu verkleinern, da die Zugabe von  
15 Aceton in einer relativ zu großen Menge zu einer Verringerung der Enzymaktivität führen kann. Die restliche Versuchsdurchführung erfolgte analog zu der vorstehend beschriebenen Vorgehensweise. In der Anreicherung konnte in einer Fraktion die gesamte Epoxidhydrolaseaktivität detektiert werden.

20 Beispiel 5: Umsetzung von Styroloxid mit Epoxidhydrolase aus S. antibioticus Tü4

a) Durchführung der Reaktion

25 Zu 250 ml des Zellaufschlusses aus Beispiel 4 mit 12,5 ml DMSO als Lösungsvermittler wurden 500 µg Styroloxid gegeben. Es wurde bei 30°C und gleichmäßigem Schütteln (250 U/min) inkubiert.

30 Nach 24 Stunden wurde die Reaktion durch Zugabe von 30 ml Essigsäureethylester abgebrochen, und die wäßrige Phase wurde extrahiert. Die organische Phase wurde im Vakuum eingeeengt. Die gaschromatographische Analyse ergab einen Enantiomerenüberschuß des Substrats von ( $ee_s[\%]$ ) von 100 und des Produkts ( $ee_p[\%]$ ) von 14.

35 Die Enantiomerenreinheit einer chiralen Substanz, welche in (R)- und in (S)-Form auftritt, wird über den Parameter ee (Enantiomerenüberschuß) ausgedrückt. Dieser ist durch folgende allgemeine Gleichung definiert:

40 
$$ee[\%] = [(X_A - X_B) / (X_A + X_B)] * 100$$

worin  $X_A$  und  $X_B$  für den Molenbruch von Enantiomer A bzw. B stehen.

45 Die Analyse der Enantiomerenüberschüsse erfolgte durch chirale Gaschromatographie unter folgenden Bedingungen: 75°C isotherm, 130 kPa, auf einer FS-Cyclodex B-I/P CS-Fused Silica Kapillarsäule

(CS-Chromatographie Service GmbH, Langerwehe) (H<sub>2</sub> Trägergas, Split 1:100, 0,25 mm x 50 mm).

Die Analyse des Produkts Phenyl-1,2-ethandiol erfolgte unter folgenden Bedingungen: 140°C isotherm unter ansonsten gleichen Bedingungen.

Die Enantioselektivität E einer enzymatischen Reaktion ist eine von Substratkonzentration und Umsatz unabhängige Konstante für ein Enzym und bei irreversibler Reaktion ohne Produktinhibition nach folgender Formel zu berechnen:

$$E = (V_{\max}/K_m)_{(R)\text{-Enantiomer}} / (V_{\max}/K_m)_{(S)\text{-Enantiomer}} = \frac{\ln[(1-U)(1-ee_s)]}{\ln[(1-U)(1+ee_s)]} = \frac{\ln[(1-U)(1+ee_p)]}{\ln[(1-U)(1-ee_p)]}$$

worin  $ee_s$  der Enantiomerenüberschuß des Substrats und  $ee_p$  der Enantiomerenüberschuß des Produkts ist und der Umsatz U nach der Formel  $U = ee_s / (ee_s + ee_p)$  berechenbar ist.

Die Auswertung erfolgte gemäß Chen, C.S., et al., (1982) J.Am.Chem.Soc. 104, 7294.

#### b) Ermittlung der Enantioselektivität

Für die Verfolgung des Reaktionsverlaufs wurden 1,5 ml Ansätze des Zellaufschlusses mit 75 ml DMSO und 7 ml Styroloxid in verschraubbaren 2 ml Reaktionsgefäßen bei 30°C geschüttelt und nach vorgegebenen Zeiten mit 300 ml Essigsäureethylester extrahiert. Tabelle 1 zeigt die Ergebnisse.

Tabelle 1:

Zeit [h]	$ee_s$ [%]	$ee_p$ [%]	Umsatz [%]
0,5	-	-	-
1	11	66	15
3,5	23	26	47
5	33	22	59
7	91	21	82
24	100	14	87

Der zeitliche Verlauf der Reaktion ist in beiliegender Figur 2 dargestellt.



Beispiel 6: Hydrolyse von Styroloxid durch die Streptomyces-Stämme *S. fradiae* Tü27 und *S. arenae* Tü495

Ganze Zellen einer 250 ml Kultur des Organismus wurden in 200 ml Natriumphosphatpuffer (0,1 M, pH 8) resuspendiert. Dazu gab man 500 µl Styroloxid und 10% (v/v) DMSO. Der Reaktionsansatz wurde bei 30°C mit 210 Upm in einem geschlossenen Erlenmeyerkolben geschüttelt. Proben (1,5 ml) wurden in verschiedenen Zeitintervallen zur Kontrolle des Reaktionsverlaufs gezogen, bei 14000 Upm 3 Minuten zentrifugiert und mit 300 µl Diethylether extrahiert. Die organischen Phasen wurden mit wasserfreien Natriumsulfat getrocknet und gaschromatographisch zur Bestimmung des Enantiomerenüberschusses, des Umsatzes und der Enantioselektivität wie oben beschrieben analysiert. Die Ergebnisse sind in folgender Tabelle 2 zusammengefaßt:

Tabelle 2:

Stamm	Enantiomerenüberschuß		Umsatz	Dauer
	ee <sub>S</sub> <sup>a</sup> [%]	ee <sub>P</sub> <sup>b</sup> [%]	[%]	[h]
Tü27	70	23	75	48
Tü495	52	38	60	24

<sup>a</sup> (R)-Styroloxid

<sup>b</sup> (S)-Phenyl-1,2-ethandiol

Beispiel 7: Einfluß von Cosolventien auf die Styroloxid-Hydrolyse.

Beispiel 6 wurde wiederholt, wobei jedoch *S. antibioticus* Tü4 als Mikroorganismus verwendet wurde, und DMSO, DMF bzw. Aceton in verschiedenen Mengen zu den Reaktionsansätzen gegeben wurden. Die Ergebnisse sind in Figur 3 dargestellt. 10 % DMSO, 5 % Aceton und 1-3 % DMF führten zu einer Zunahme des Enantiomerenüberschusses und damit der Enantioselektivität.

Beispiel 7: Hydrolyse von 3-Penylethylglycidat (3-PEG) und n-Decan-1,2-oxid durch Epoxidhydrolase aus *S. antibioticus* Tü4

Beispiel 5 wurde wiederholt, wobei anstelle von Styroloxid 3-PEG bzw. n-Decan-1,2-oxid als Substrat eingesetzt wurde.

a) Umsetzung von 3-PEG:

Im Unterschied zu Beispiel 5 erfolgte die gaschromatographische Analyse von 3-PEG bei 60kPa, 130°C (60 min), 180°C (5 min), 10 °C/min

- b) Umsetzung von Decan-1,2-oxid  
Das gebildete Decan-1,2-diol wurde mit Aceton und p-Toluol-  
sulfonsäure als Katalysator in Ethylacetat derivatisiert.  
Isopropyliden-decan-1,2-diol wurde bei 120 °C unter den in  
5 Beispiel 5 angegebenen Bedingungen analysiert.

10

15

20

25

30

35

40

45

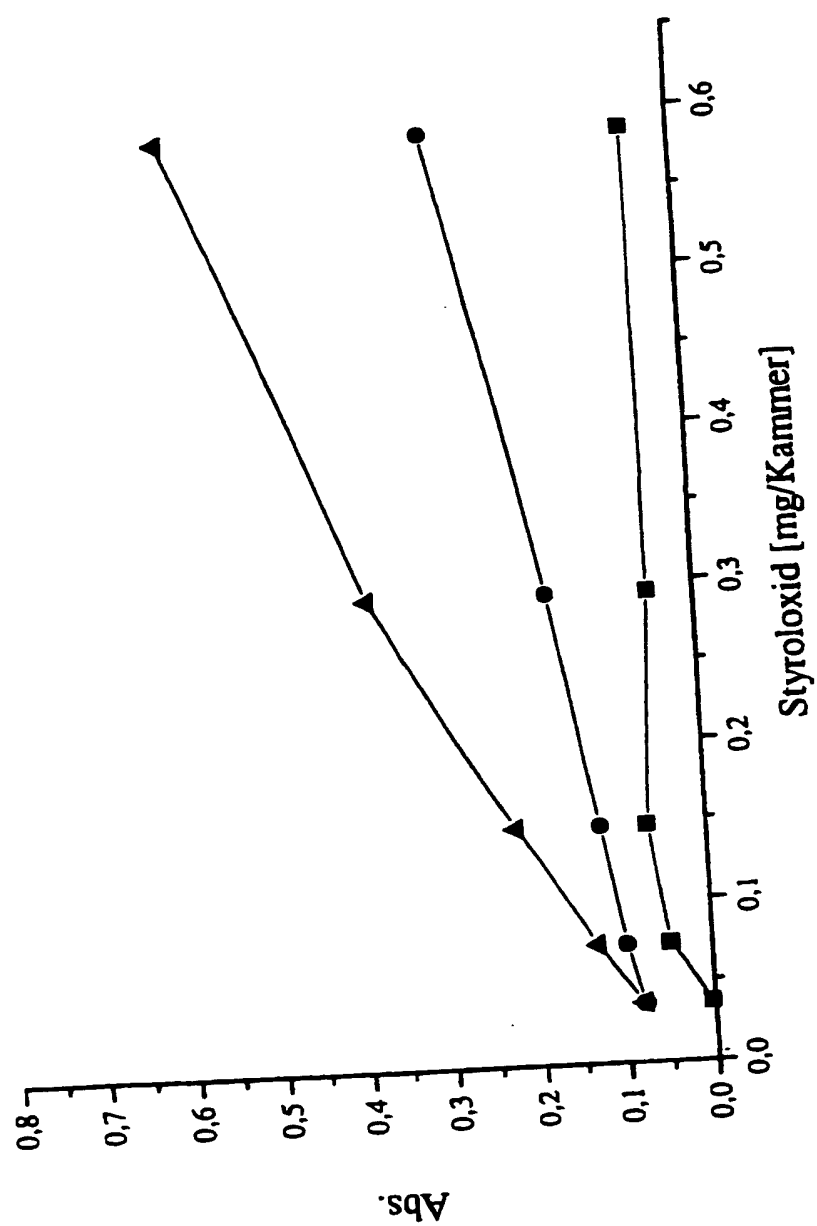
## Patentansprüche

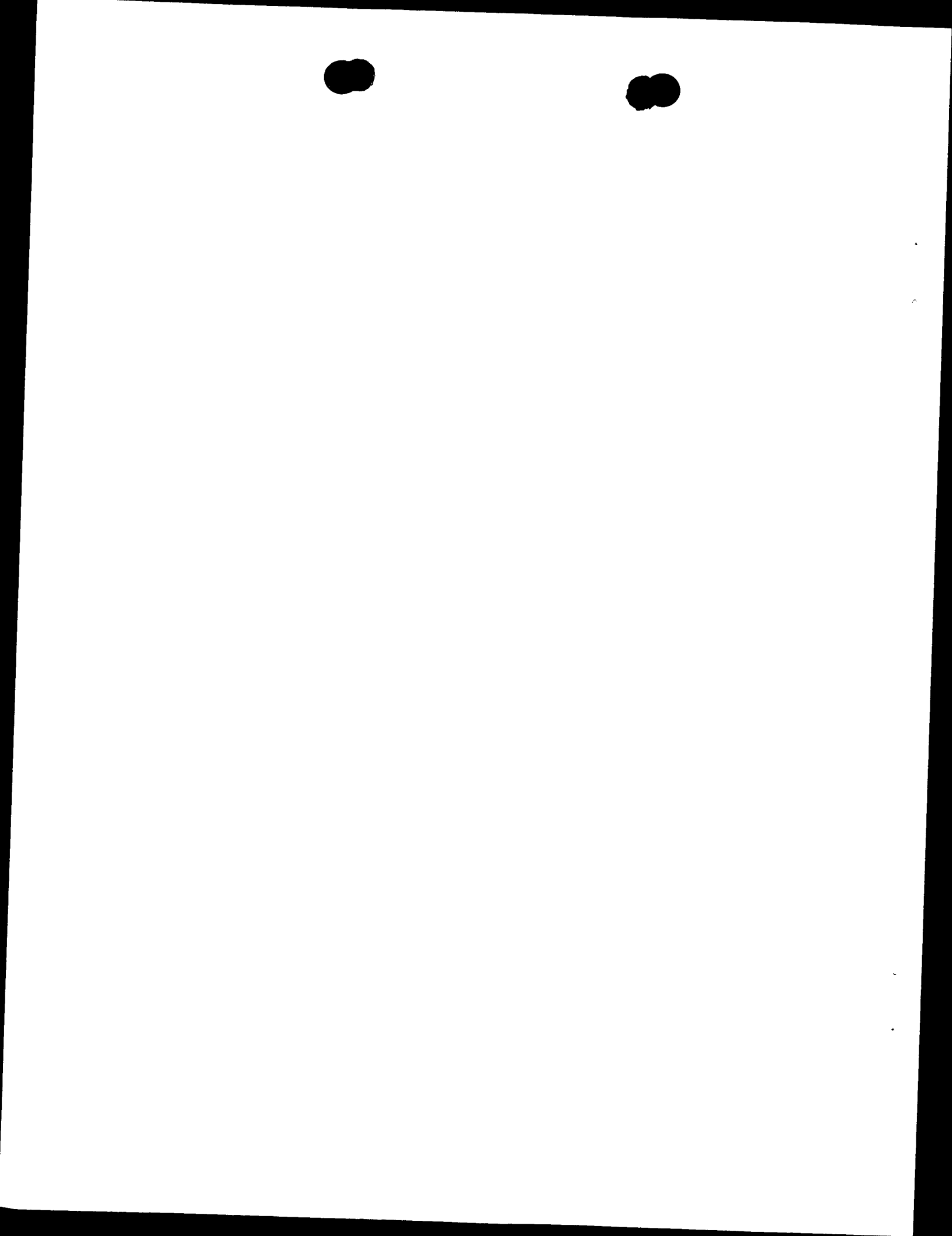
1. Epoxidhydrolase (E.C. 3.3.2.3) aus einem Mikroorganismus der Gattung *Streptomyces* sp.  
5
2. Epoxidhydrolase nach Anspruch 1, gekennzeichnet durch wenigstens eine der folgenden Eigenschaften:
  - 10 a) hydrolytische Epoxidspaltung eines Styroloxids, und wenigstens einer weiteren Verbindung ausgewählt unter 3-Phenyl-ethylglycidaten, n-Hexan-1,2-oxiden, n-Decan-1,2-oxiden und Indenoxiden;
  - 15 b) Umsetzung eines Racemats von Styroloxid mit einer Enantioeselektivität  $E \geq 2$  zu (S)-Phenyl-1,2-ethanol.
3. Epoxidhydrolase isoliert aus Bakterien der Gattung *Streptomyces* sp., insbesondere aus der Art *S. griseus*, *S. thermovulgaris*, *S. antibioticus*, *S. arenae* und *S. fradiae*, vorzugsweise aus den Stämmen *Streptomyces griseus* (DSM 40236 und DSM 13447), *Streptomyces thermovulgaris* (DSM 40444 und DSM 13448) *Streptomyces antibioticus* Tü 4 (DSM 12925), *Streptomyces arenae* Tü495 (DSM 40737 und DSM 12134) oder *Streptomyces fradiae* Tü 27 (DSM 12131).  
20  
25
4. *Streptomyces antibioticus* Tü 4 hinterlegt bei der DSMZ unter der Hinterlegungsnummer DSM 12925.
- 30 5. Verfahren zur Trennung von Epoxid-Enantiomerengemischen, dadurch gekennzeichnet, daß man
  - 35 a) ein Epoxid-Enantiomerengemisch, welches ein Epoxidhydrolase-Substrat umfasst, mit einer Epoxidhydrolase gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3, einem Mikroorganismus der Gattung *Streptomyces* sp., einem Epoxidhydrolase-haltigen Homogenat davon oder einer Fraktion dieses Homogenates inkubiert;
  - 40 b) das Enantiomerengemisch, vorzugsweise bis zur Einstellung des Reaktionsgleichgewichtes, umsetzt; und
  - 45 c) das Reaktionsgemisch auftrennt.

6. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß man ein Enantiomerengemisch eines Epoxids umsetzt, das ausgewählt ist unter Styroloxiden, 3-Phenylglycidaten, Hexan-1,2-oxiden, Decan-1,2-oxiden und Indenoxiden.
- 5
7. Nachweisverfahren für Epoxidhydrolase, wobei man
- 10
- a) einen Analyten, in welchen man Epoxidhydrolaseaktivität vermutet, mit einem epoxidhaltigen Substrat für die Epoxidhydrolase unter Reaktionsbedingungen inkubiert;
- 15
- b) mit nicht umgesetztem Epoxid in Anwesenheit von 4-Nitrobenzylpyridin (NBP) eine Farbreaktion durchführt; und
- c) den Ansatz aus Schritt b) auf Abnahme der Farbstoffkonzentration, relativ zu einem Epoxidhydrolase-freien Kontrollansatz analysiert.
- 20
8. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß man die relative Abnahme der Farbstoffkonzentration quantitativ bestimmt und daraus die Epoxidhydrolaseaktivität im Analyten ermittelt.
- 25
9. Verfahren nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß der Analyt ein Mikroorganismus, ein Homogenat davon oder eine Fraktion dieses Homogenates ist.
- 30
10. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß der Mikroorganismus ein Bakterium aus der Gattung Streptomyces sp. ist.
- 35
11. Verfahren nach einem der Ansprüche 7 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß das epoxidhaltige Substrat Styroloxid, 3-Phenylglycidat, Hexan-1,2-oxid und/oder Indenoxid in enantiomerenreiner Form oder ein Enantiomerengemisch davon ist.
- 40
12. Screening-Verfahren zum Nachweis von Mikroorganismen mit Epoxidhydrolaseaktivität und/oder mit der Befähigung zur enantioselektiven Hydrolyse von Epoxiden, umfassend ein Nachweisverfahren nach einem der Ansprüche 7 bis 11.
- 45
13. Verwendung einer Epoxidhydrolase gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3, eines Mikroorganismus der Gattung Streptomyces sp., eines Epoxidhydrolase-haltigen Homogenates davon oder einer Fraktion dieses Homogenates zur enantioselektiven Hydrolyse von Epoxiden.

14. Verwendung einer Epoxidhydrolase gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3, eines Mikroorganismus der Gattung Streptomyces sp., eines Epoxidhydrolase-haltigen Homogenates davon oder einer Fraktion dieses Homogenates zur enantioselektiven Herstellung von Hydroxiden aus den korrespondierenden Epoxiden.
15. Verfahren zur Gewinnung von Epoxydhydrolasen (E.C. 3.3.2.3), dadurch gekennzeichnet, daß man
- a) aus einer Kultur eines Mikroorganismus der Gattung Streptomyces sp. ein Zellhomogenat herstellt;
  - b) das Homogenat fraktioniert, wobei man die erhaltenen Fraktionen auf Epoxidhydrolase-Aktivität, gegebenenfalls unter Anwendung eines Nachweisverfahrens gemäß einem der Ansprüche 7 bis 11, testet; und
  - c) Fraktionen mit Epoxidhydrolase-Aktivität vereinigt und gegebenenfalls weiter fraktioniert.



**Fig.1**





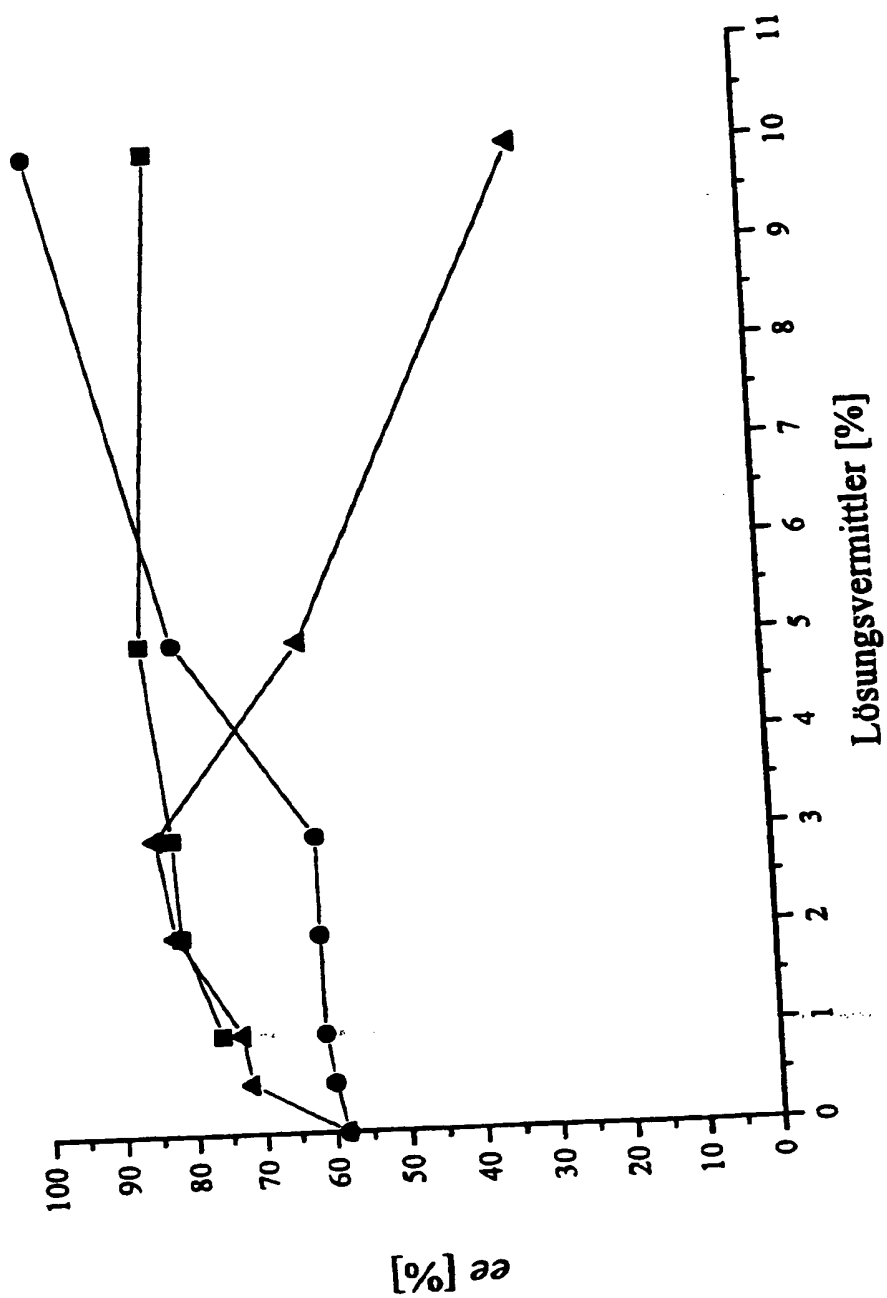


Fig. 3



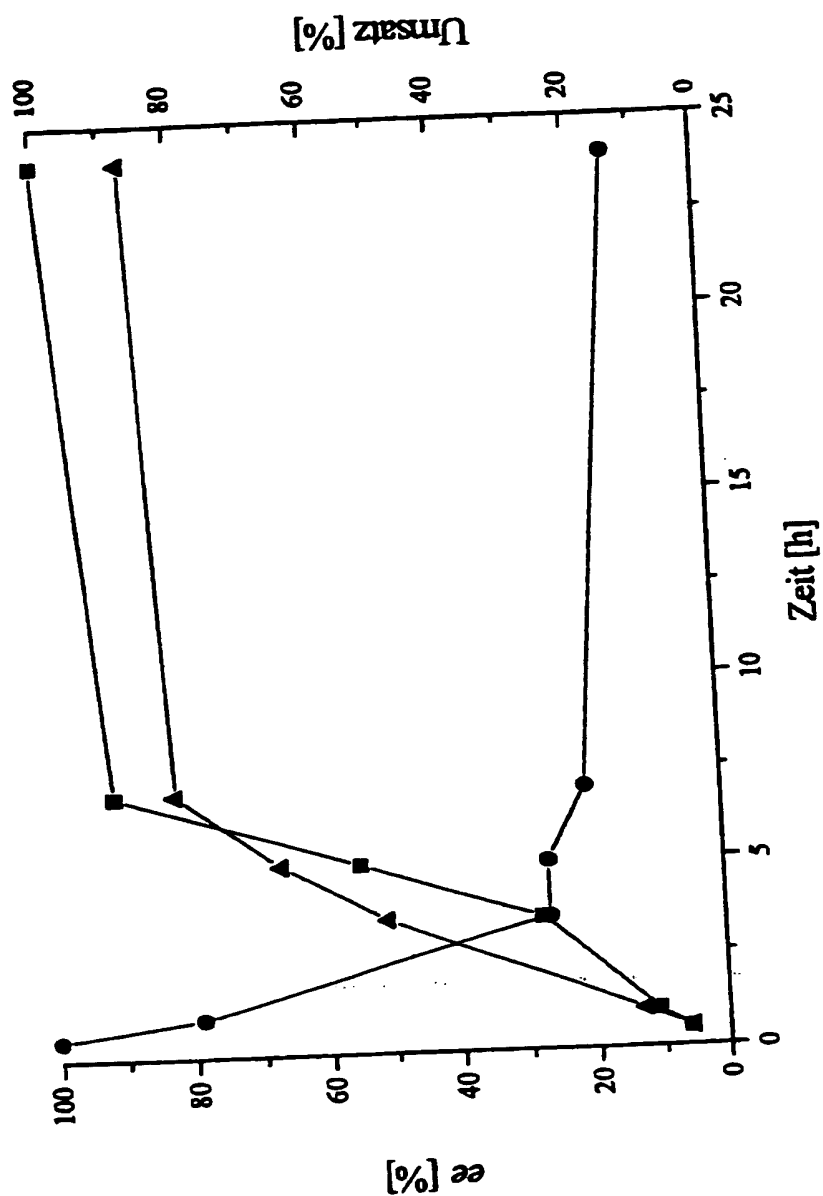
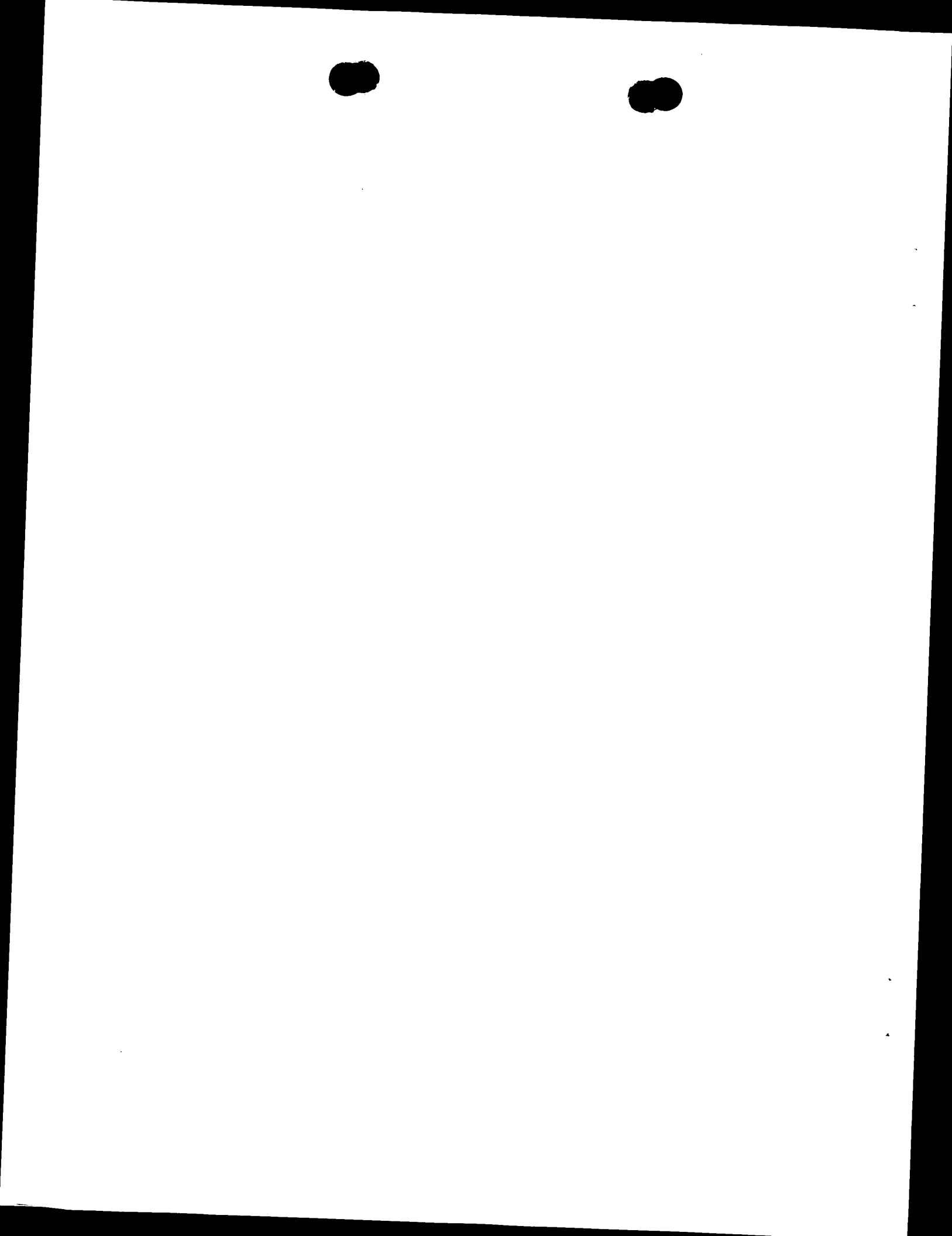


Fig. 2



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/EP 00/07211

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
IPC 7 C12N15/31 C12N9/14 C12P41/00 C12Q1/34

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
IPC 7 C12N C12P C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	LUTZ-WAHL SABINE ET AL: "Stereo- and regioselective hydroxylation of alpha-ionone by Streptomyces strains." APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, vol. 64, no. 10, October 1998 (1998-10), pages 3878-3881, XP000946739 ISSN: 0099-2240 the whole document	4
X	ZOCHER FRANK ET AL: "A colorimetric assay suitable for screening epoxide hydrolase activity." ANALYTICA CHIMICA ACTA, vol. 391, no. 3, 4 June 1999 (1999-06-04), pages 345-351, XP000946717 ISSN: 0003-2670 the whole document	7-12

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

### \* Special categories of cited documents:

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- \*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- \*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- \*Z\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

3 October 2000

Date of mailing of the international search report

27. 10. 00

Name and mailing address of the ISA  
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Smalt, R

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/EP 00/07211

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>RINK R ET AL: "PRIMARY STRUCTURE AND CATALYTIC MECHANISM OF THE EPOXIDE HYDROLASE FROM AGROBACTERIUM RADIOBACTER AD1"</p> <p>JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY,US,AMERICAN SOCIETY OF BIOLOGICAL CHEMISTS, BALTIMORE, MD, vol. 272, no. 23, 6 June 1997 (1997-06-06), pages 14650-14657, XP002063249 ISSN: 0021-9258 page 14651, right-hand column, paragraph 3</p>	7-12
A	<p>---            ARCHELAS A ET AL: "Epoxide hydrolases: new tools for the synthesis of fine organic chemicals"</p> <p>TRENDS IN BIOTECHNOLOGY,GB,ELSEVIER PUBLICATIONS, CAMBRIDGE, vol. 16, no. 3, 1 March 1998 (1998-03-01), pages 108-116, XP004108588 ISSN: 0167-7799 the whole document</p>	
A	<p>---            WO 98 53081 A (JANSSEN DICK BAREND ;LUTJE SPELBERG JEFFREY HARALD (NL); RINK RICK) 26 November 1998 (1998-11-26) page 10, line 10 - line 27; figure 3</p>	
A	<p>---            MISCHITZ M ET AL: "Asymmetric Microbial Hydrolysis of Epoxides"</p> <p>TETRAHEDRON: ASYMMETRY,NL,ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, vol. 6, no. 6, 1 June 1995 (1995-06-01), pages 1261-1272, XP004048169 ISSN: 0957-4166 the whole document</p>	5-15
A	<p>---            ARCHER I V J: "Epoxide Hydrolases as Asymmetric Catalysts"</p> <p>TETRAHEDRON,NL,ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, vol. 53, no. 46, 17 November 1997 (1997-11-17), pages 15617-15662, XP004106413 ISSN: 0040-4020 page 15638, paragraph 5 -page 15644, paragraph 1</p> <p style="text-align: center;">--- -/--</p>	

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/EP 00/07211

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>WEIJERS CAREL A G M ET AL: "Epoxide hydrolases from yeast and other sources: versatile tools in biocatalysis." JOURNAL OF MOLECULAR CATALYSIS B ENZYMATIC, vol. 6, no. 3, 11 March 1998 (1998-03-11), pages 199-214, XP000946716 ISSN: 1381-1177 the whole document</p>	1-15
P,X	<p>--- ZOCHER F ET AL: "Epoxide hydrolase activity of Streptomyces strains" JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY,NL,ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, vol. 77, no. 2-3, February 2000 (2000-02), pages 287-292, XP004185827 ISSN: 0168-1656 the whole document -----</p>	

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
**PCT/EP00/07211**

## Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

**see additional sheet**

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

### Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.



FURTHER INFORMATION PCT/ISA/210

The International Searching Authority found that this International Application contains several inventions or groups of inventions, as follows:

1. Claims Nos.: 1-6, 13, 14 completely, and claim partially

Epoxide hydrolases from a microorganism of the genus *Streptomyces*, the use thereof for the separation of epoxide-enantiomer mixtures, the strain Tü4 of *Streptomyces antibioticus* from which a hydrolase can be isolated, and a method for obtaining epoxide hydrolases from a culture of a microorganism of the genus *Streptomyces*.

2. Claims Nos.: 7-12 completely, and claim 15 partially

Method for screening epoxide hydrolase according to which an epoxide-containing substrate is incubated together with an analyte and the non-reacted epoxide is detected with 4-nitrobenzyl pyridine (NBP) by color reaction. Use of said method for detecting microorganisms that have epoxide hydrolase activity, and method for obtaining epoxide hydrolases from a *Streptomyces* culture using said screening method.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 00/07211

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
---	---------------------	----------------------------	---------------------

WO 9853081	A	26-11-1998	
		EP 0879890 A	25-11-1998
		AU 7677298 A	11-12-1998
		EP 0983367 A	08-03-2000

# INTERNATIONALE RESEARCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT, P 00/07211

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES  
IPK 7 C12N15/31 C12N9/14 C12P41/00 C12Q1/34

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)  
IPK 7 C12N C12P C12Q

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	LUTZ-WAHL SABINE ET AL: "Stereo- and regioselective hydroxylation of alpha-ionone by Streptomyces strains." APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, Bd. 64, Nr. 10, Oktober 1998 (1998-10), Seiten 3878-3881, XP000946739 ISSN: 0099-2240 das ganze Dokument	4
X	ZOCHER FRANK ET AL: "A colorimetric assay suitable for screening epoxide hydrolase activity." ANALYTICA CHIMICA ACTA, Bd. 391, Nr. 3, 4. Juni 1999 (1999-06-04), Seiten 345-351, XP000946717 ISSN: 0003-2670 das ganze Dokument	7-12

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

- \* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
- \*A\* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
  - \*E\* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
  - \*L\* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
  - \*O\* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
  - \*P\* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

- \*T\* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
- \*X\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden
- \*Y\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
- \*Z\* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

3. Oktober 2000

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

27. 10. 00

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde  
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Smalt, R

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile Betr. Anspruch Nr.

X RINK R ET AL: "PRIMARY STRUCTURE AND CATALYTIC MECHANISM OF THE EPOXIDE HYDROLASE FROM AGROBACTERIUM RADIOBACTER AD1"  
JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY,US,AMERICAN SOCIETY OF BIOLOGICAL CHEMISTS, BALTIMORE, MD, Bd. 272, Nr. 23,  
6. Juni 1997 (1997-06-06), Seiten 14650-14657, XP002063249  
ISSN: 0021-9258  
Seite 14651, rechte Spalte, Absatz 3

7-12

A ARCHELAS A ET AL: "Epoxide hydrolases: new tools for the synthesis of fine organic chemicals"  
TRENDS IN BIOTECHNOLOGY,GB,ELSEVIER PUBLICATIONS, CAMBRIDGE,  
Bd. 16, Nr. 3, 1. März 1998 (1998-03-01), Seiten 108-116, XP004108588  
ISSN: 0167-7799  
das ganze Dokument

A WO 98 53081 A (JANSSEN DICK BAREND ;LUTJE SPELBERG JEFFREY HARALD (NL); RINK RICK)  
26. November 1998 (1998-11-26)  
Seite 10, Zeile 10 - Zeile 27; Abbildung 3

A MISCHITZ M ET AL: "Asymmetric Microbial Hydrolysis of Epoxides"  
TETRAHEDRON: ASYMMETRY,NL,ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM,  
Bd. 6, Nr. 6, 1. Juni 1995 (1995-06-01), Seiten 1261-1272, XP004048169  
ISSN: 0957-4166  
das ganze Dokument

5-15

A ARCHER I V J: "Epoxide Hydrolases as Asymmetric Catalysts"  
TETRAHEDRON,NL,ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM,  
Bd. 53, Nr. 46,  
17. November 1997 (1997-11-17), Seiten 15617-15662, XP004106413  
ISSN: 0040-4020  
Seite 15638, Absatz 5 -Seite 15644, Absatz 1

-/--

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>WEIJERS CAREL A G M ET AL: "Epoxide hydrolases from yeast and other sources: versatile tools in biocatalysis." JOURNAL OF MOLECULAR CATALYSIS B ENZYMATIC, Bd. 6, Nr. 3, 11. März 1998 (1998-03-11), Seiten 199-214, XP000946716 ISSN: 1381-1177 das ganze Dokument</p> <p>---</p>	1-15
P,X	<p>ZOCHER F ET AL: "Epoxide hydrolase activity of Streptomyces strains" JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY,NL,ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, Bd. 77, Nr. 2-3, Februar 2000 (2000-02), Seiten 287-292, XP004185827 ISSN: 0168-1656 das ganze Dokument</p> <p>-----</p>	

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen  
PCT/EP 00/07211

## Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☐ Ansprüche Nr. \_\_\_\_\_  
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich \_\_\_\_\_
2. ☐ Ansprüche Nr. \_\_\_\_\_  
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich \_\_\_\_\_
3. ☐ Ansprüche Nr. \_\_\_\_\_  
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

## Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

siehe Zusatzblatt

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2. ☒ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchengebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr. \_\_\_\_\_
4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt: \_\_\_\_\_

### Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- ☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
- ☐ Die Zahlung zusätzlicher Recherchengebühren erfolgte ohne Widerspruch.

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/EP 00/07211

## WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere (Gruppen von) Erfindungen enthält, nämlich:

1. Ansprüche: 1-6,13,14 komplett, und Anspruch 15 partiell

Epoxidhydrolase aus einem Mikroorganismus der Gattung Streptomyces, deren Verwendung zur Trennung von Epoxid-Enantiomergemischen, der Stamm Tü4 von Streptomyces antibioticus, woraus sich solch eine Hydrolase isolieren lässt, und Verfahren zur Gewinnung von Epoxidhydrolasen aus einer Kultur eines Mikroorganismus der Gattung Streptomyces.

2. Ansprüche: 7-12 komplett, und Anspruch 15 partiell

Verfahren zur Nachweis von Epoxidhydrolase wobei ein epoxidhaltiges Substrat mit einem Analyten inkubiert wird, und das nicht umgesetzte Epoxid mit 4-Nitrobenzylpyridin (NBP) durch eine Farbreaktion nachgewiesen wird. Verwendung dieses Verfahrens zum Nachweis von Mikroorganismen mit Epoxidhydrolaseaktivität, und Verfahren zur Gewinnung von Epoxidhydrolasen aus einer Streptomyces Kultur unter Anwendung des genannten Nachweisverfahrens.

# INTERNATIONALER RESEARCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/07211

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9853081 A	26-11-1998	EP 0879890 A	25-11-1998
		AU 7677298 A	11-12-1998
		EP 0983367 A	08-03-2000
<hr/>			



VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT  
AUF DEM GEBIET DES PATENTWESSENS

PCT

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

(Artikel 18 sowie Regeln 43 und 44 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts <b>M/40065-PCT</b>	<b>WEITERES VORGEHEN</b> siehe Mitteilung über die Übermittlung des internationalen Recherchenberichts (Formblatt PCT/SA/220) sowie, soweit zutreffend, nachstehender Punkt 5	
Internationales Aktenzeichen <b>PCT/ EP 00/ 07211</b>	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) <b>26/07/2000</b>	(Frühestes) Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) <b>27/07/1999</b>
Anmelder <b>BASF AKTIENGESELLSCHAFT</b>		

Dieser internationale Recherchenbericht wurde von der Internationalen Recherchenbehörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 18 übermittelt. Eine Kopie wird dem Internationalen Büro übermittelt.

Dieser internationale Recherchenbericht umfaßt insgesamt 6 Blätter.

☒ Darüber hinaus liegt ihm jeweils eine Kopie der in diesem Bericht genannten Unterlagen zum Stand der Technik bei.

1. Grundlage des Berichts

- a. Hinsichtlich der **Sprache** ist die internationale Recherche auf der Grundlage der internationalen Anmeldung in der Sprache durchgeführt worden, in der sie eingereicht wurde, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

☐ Die internationale Recherche ist auf der Grundlage einer bei der Behörde eingereichten Übersetzung der internationalen Anmeldung (Regel 23.1 b)) durchgeführt worden.

- b. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale Recherche auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das

☐ in der internationalen Anmeldung in Schriftlicher Form enthalten ist.

☐ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

☐ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.

☐ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

☐ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.

☐ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfaßten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

2. ☐ Bestimmte Ansprüche haben sich als nicht recherchierbar erwiesen (siehe Feld I).

3. ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung (siehe Feld II).

4. Hinsichtlich der Bezeichnung der Erfindung

☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

☐ wurde der Wortlaut von der Behörde wie folgt festgesetzt:

5. Hinsichtlich der Zusammenfassung

☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

☐ wurde der Wortlaut nach Regel 38.2b) in der in Feld III angegebenen Fassung von der Behörde festgesetzt. Der Anmelder kann der Behörde innerhalb eines Monats nach dem Datum der Absendung dieses internationalen Recherchenberichts eine Stellungnahme vorlegen.

6. Folgende Abbildung der Zeichnungen ist mit der Zusammenfassung zu veröffentlichen: Abb. Nr. -

☐ wie vom Anmelder vorgeschlagen

☐ weil der Anmelder selbst keine Abbildung vorgeschlagen hat.

☐ weil diese Abbildung die Erfindung besser kennzeichnet.

☐ keine der Abb.



**Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)**

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☐ Ansprüche Nr.  
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
2. ☐ Ansprüche Nr.  
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
3. ☐ Ansprüche Nr.  
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

**Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)**

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

siehe Zusatzblatt

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2. ☒ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

**Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs**

- ☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
- ☐ Die Zahlung zusätzlicher Recherchegebühren erfolgte ohne Widerspruch.



## WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere (Gruppen von) Erfindungen enthält, nämlich:

1. Ansprüche: 1-6,13,14 komplett, und Anspruch 15 partiell

Epoxidhydrolase aus einem Mikroorganismus der Gattung Streptomyces, deren Verwendung zur Trennung von Epoxid-Enantiomergemischen, der Stamm Tü4 von Streptomyces antibioticus, woraus sich solch eine Hydrolase isolieren lässt, und Verfahren zur Gewinnung von Epoxidhydrolasen aus einer Kultur eines Mikroorganismus der Gattung Streptomyces.

2. Ansprüche: 7-12 komplett, und Anspruch 15 partiell

Verfahren zur Nachweis von Epoxidhydrolase wobei ein epoxidhaltiges Substrat mit einem Analyten inkubiert wird, und das nicht umgesetzte Epoxid mit 4-Nitrobenzylpyridin (NBP) durch eine Farbreaktion nachgewiesen wird. Verwendung dieses Verfahrens zum Nachweis von Mikroorganismen mit Epoxidhydrolaseaktivität, und Verfahren zur Gewinnung von Epoxidhydrolasen aus einer Streptomyces Kultur unter Anwendung des genannten Nachweisverfahrens.



A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES  
 IPK 7 C12N15/31 /14 C12P41/00 C12Q1/34

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12N C12P C12Q

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie <sup>o</sup>	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	LUTZ-WAHL SABINE ET AL: "Stereo- and regioselective hydroxylation of alpha-ionone by Streptomyces strains." APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, Bd. 64, Nr. 10, Oktober 1998 (1998-10), Seiten 3878-3881, XP000946739 ISSN: 0099-2240 das ganze Dokument	4
X	ZOCHER FRANK ET AL: "A colorimetric assay suitable for screening epoxide hydrolase activity." ANALYTICA CHIMICA ACTA, Bd. 391, Nr. 3, 4. Juni 1999 (1999-06-04), Seiten 345-351, XP000946717 ISSN: 0003-2670 das ganze Dokument	7-12

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

<sup>o</sup> Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

3. Oktober 2000

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

27. 10. 00

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
 NL - 2280 HV Rijswijk  
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
 Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Smalt, R





C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICHE HINE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	<p>RINK R ET AL: "PRIMARY STRUCTURE AND CATALYTIC MECHANISM OF THE EPOXIDE HYDROLASE FROM AGROBACTERIUM RADIOBACTER AD1"</p> <p>JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY,US,AMERICAN SOCIETY OF BIOLOGICAL CHEMISTS, BALTIMORE, MD, Bd. 272, Nr. 23, 6. Juni 1997 (1997-06-06), Seiten 14650-14657, XP002063249 ISSN: 0021-9258 Seite 14651, rechte Spalte, Absatz 3</p>	7-12
A	<p>---            ARCHELAS A ET AL: "Epoxide hydrolases: new tools for the synthesis of fine organic chemicals"</p> <p>TRENDS IN BIOTECHNOLOGY,GB,ELSEVIER PUBLICATIONS, CAMBRIDGE, Bd. 16, Nr. 3, 1. März 1998 (1998-03-01), Seiten 108-116, XP004108588 ISSN: 0167-7799 das ganze Dokument</p>	
A	<p>---            WO 98 53081 A (JANSSEN DICK BAREND ;LUTJE SPELBERG JEFFREY HARALD (NL); RINK RICK)            26. November 1998 (1998-11-26)            Seite 10, Zeile 10 - Zeile 27; Abbildung 3</p>	
A	<p>---            MISCHITZ M ET AL: "Asymmetric Microbial Hydrolysis of Epoxides"</p> <p>TETRAHEDRON: ASYMMETRY,NL,ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, Bd. 6, Nr. 6, 1. Juni 1995 (1995-06-01), Seiten 1261-1272, XP004048169 ISSN: 0957-4166 das ganze Dokument</p>	5-15
A	<p>---            ARCHER I V J: "Epoxide Hydrolases as Asymmetric Catalysts"</p> <p>TETRAHEDRON,NL,ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, Bd. 53, Nr. 46, 17. November 1997 (1997-11-17), Seiten 15617-15662, XP004106413 ISSN: 0040-4020 Seite 15638, Absatz 5 -Seite 15644, Absatz 1</p> <p>---</p> <p>-/--</p>	



C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	WEIJERS CAREL A G M ET AL: "Epoxide hydrolases from yeast and other sources: versatile tools in biocatalysis." JOURNAL OF MOLECULAR CATALYSIS B ENZYMATIC, Bd. 6, Nr. 3, 11. März 1998 (1998-03-11), Seiten 199-214, XP000946716 ISSN: 1381-1177 das ganze Dokument ---	
P,X	ZOCHER F ET AL: "Epoxide hydrolase activity of Streptomyces strains" JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY,NL,ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, Bd. 77, Nr. 2-3, Februar 2000 (2000-02), Seiten 287-292, XP004185827 ISSN: 0168-1656 das ganze Dokument -----	1-15



21

**INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT**

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/07211

Im Recherchenbericht  
angeführtes PatentdokumentDatum der  
VeröffentlichungMitglied(er) der  
PatentfamilieDatum der  
Veröffentlichung

WO 9853081

A

26-11-1998

EP

0879890 A

25-11-1998

AU

7677298 A

11-12-1998

EP

0983367 A

08-03-2000



# VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

## PCT

REC'D 12 NOV 2001

### INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)

T 8


Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts M/40065-PCT	<b>WEITERES VORGEHEN</b> siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsberichts (Formblatt PCT/IPEA/416)	
Internationales Aktenzeichen PCT/EP00/07211	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 26/07/2000	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) 27/07/1999
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK C12N15/31		
Anmelder BASF AKTIENGESELLSCHAFT et al.		

1. Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.
2. Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 6 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.
  - ☒ Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).

Diese Anlagen umfassen insgesamt 3 Blätter.

3. Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:

- I ☒ Grundlage des Berichts
- II ☐ Priorität
- III ☐ Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit
- IV ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung
- V ☒ Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung
- VI ☐ Bestimmte angeführte Unterlagen
- VII ☐ Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung
- VIII ☒ Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Datum der Einreichung des Antrags  21/02/2001	Datum der Fertigstellung dieses Berichts  07.11.2001
Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde:   Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Bevollmächtigter Bediensteter  Strobel, A  Tel. Nr. +49 89 2399 7362







**I. Grundlage des Berichts**

1. Hinsichtlich der **Bestandteile** der internationalen Anmeldung (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigelegt, weil sie keine Änderungen enthalten (Regeln 70.16 und 70.17)*):  
**Beschreibung, Seiten:**

1-14                      ursprüngliche Fassung

**Patentansprüche, Nr.:**

1-16                      eingegangen am                      15/10/2001    mit Schreiben vom    15/10/2001

**Zeichnungen, Blätter:**

1/3-3/3                      ursprüngliche Fassung

2. Hinsichtlich der **Sprache**: Alle vorstehend genannten Bestandteile standen der Behörde in der Sprache, in der die internationale Anmeldung eingereicht worden ist, zur Verfügung oder wurden in dieser eingereicht, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

Die Bestandteile standen der Behörde in der Sprache: zur Verfügung bzw. wurden in dieser Sprache eingereicht; dabei handelt es sich um

- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen Recherche eingereicht worden ist (nach Regel 23.1(b)).
- ☐ die Veröffentlichungssprache der internationalen Anmeldung (nach Regel 48.3(b)).
- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen vorläufigen Prüfung eingereicht worden ist (nach Regel 55.2 und/oder 55.3).

3. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale vorläufige Prüfung auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das:

- ☐ in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.
- ☐ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.
- ☐ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfassten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

4. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:



# INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/EP00/07211

- ☐ Beschreibung,      Seiten:  
☐ Ansprüche,      Nr.:  
☐ Zeichnungen,      Blatt:

5. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)).

*(Auf Ersatzblätter, die solche Änderungen enthalten, ist unter Punkt 1 hinzuweisen; sie sind diesem Bericht beizufügen).*

6. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

## V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

### 1. Feststellung

Neuheit (N)	Ja: Ansprüche	1-3, 5-16
	Nein: Ansprüche	4
Erfinderische Tätigkeit (ET)	Ja: Ansprüche	
	Nein: Ansprüche	1-16: Nein
Gewerbliche Anwendbarkeit (GA)	Ja: Ansprüche	1-16
	Nein: Ansprüche	

### 2. Unterlagen und Erklärungen siehe Beiblatt

## VIII. Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Zur Klarheit der Patentansprüche, der Beschreibung und der Zeichnungen oder zu der Frage, ob die Ansprüche in vollem Umfang durch die Beschreibung gestützt werden, ist folgendes zu bemerken:  
siehe Beiblatt



**Zu Punkt I**

**Grundlage des Bescheides**

Die beanspruchte Priorität scheint gültig zu sein.

Der neue Anspruchssatz erfüllt die Anforderungen von Artikel 34(2)b PCT

**Zu Punkt V**

**Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung**

Durch die Aufnahme des Merkmals "Streptomyces" in unabhängigen Anspruch 7 ist der Einwand mangelnder Einheitlichkeit behoben.

Es wird auf folgende Dokument verwiesen:

D1: LUTZ-WAHL SABINE ET AL, APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, Bd. 64, Nr. 10, Oktober 1998 Seiten 3878-3881

D2: ZOCHER FRANK ET AL, ANALYTICA CHIMICA ACTA, Bd. 391, Nr. 3, 4. Juni 1999 (1999-06-04), Seiten 345-351

D3: RINK R ET AL., JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY Bd. 272, Nr. 23, 6. Juni 1997 Seiten 14650-14657

**1. Neuheit (Nichterfüllung von Artikel 33(2) PCT)**

**Anspruch 4 ist nicht neu**

D1 beschreibt den Streptomyces antibioticus Stamm Tü4, den die Anmelderin unter der Nummer DSM 12925 bei der DSMZ hinterlegt hat. Nach D1 ist dieser Stamm Bestandteil der Sammlung des Instituts für Mikrobiologie/Biotechnologie der Universität Tübingen (D1, Abstract, Seite 3878, rechte Spalte, erster Absatz). Damit ist der besagte Stamm offenbart und der Öffentlichkeit zugänglich, da es der wissenschaftlichen Praxis entspricht, veröffentlichtes Material anderen zugänglich zu machen. In der Anleitung für Autoren von "Applied and Environmental Microbiology", der D1 veröffentlichenden wissenschaftlichen Zeitschrift, wird ausdrücklich festgelegt, daß neu beschriebenes biologisches Material, u.a. Bakterienstämme, entweder von den Autoren in einer staatlichen Sammlung hinterlegt oder Mitgliedern der wissenschaftlichen Gemeinschaft



zugänglich gemacht werden müssen. Im übrigen ist es für die regionale Phase an der Anmelderin nachzuweisen, daß der Stamm Tü 4 (DSM 12925) der wissenschaftlichen Öffentlichkeit nicht zugänglich war.

**2. Erfinderische Tätigkeit: Ansprüche 5-16 sind nicht erfinderisch**

**2.1 Ansprüche 1-3, 5, 6, 11-13 und 14-16**

Besagte Ansprüche beziehen sich auf eine Epoxidhydrolase, ein Verfahren zur Trennung von Epoxid-Enantionmerengemischen bzw. zur enantioselektiven Hydrolyse von Epoxiden mittels u.a. einer Epoxidhydrolase aus *Streptomyces* und schließlich die Verwendung von Mikroorganismen der Gattung *Streptomyces* zur Gewinnung von Epoxidhydrolasen. Besagte Epoxidhydrolasen sind jedoch nicht offenbart (siehe VIII.1). Aus diesem Grund sind Ansprüche 5, 6, und 11-16 nicht erfinderisch (Artikel 33(3) PCT).

**2.2 Ansprüche 7-10**

Im Lichte des relevanten Stands der Technik, der durch die Dokumente D2 und D3 gebildet wird, ist die Anspruch 7 zugrunde liegende Aufgabe die Bereitstellung einer Methode zum Nachweis für Epoxidhydrolasen aus *Streptomyces*. Die Lösung dafür liegt in der Anwendung des NBP-basierten kolorimetrischen Nachweisverfahrens auf *Streptomyces*lysate oder -Zellen oder Fraktionen des Lysats. Diese Lösung ist trivial, da sie der Fachmann sofort auf *Streptomyces* anwenden würde. Dies bedeutet nicht, daß der Fachmann dabei eine ex post Analyse vornehmen würde. Vielmehr muß der Fachmann natürlich die zu lösende Aufgabe kennen, wie soeben ausgeführt wurde.

Anspruch 10 entspricht also nicht Artikel 33(3) PCT.

**Zu Punkt VIII**

**Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung**

**1. Ansprüche 1-3, 5, 6, sowie 13-15 genügen nicht Artikel 5 PCT**

Besagte Ansprüche beziehen sich auf eine Epoxidhydrolase aus einem Mikroorganismus der Gattung *Streptomyces*. Die Anmeldung offenbart jedoch nicht, wie besagtes Produkt zu erhalten ist. Im übrigen fehlt den Ansprüchen 1-3





auch die Neuheit, weil sie kein technisches Merkmal enthalten, daß sie von bereits bekannten Epoxidhydrolasen abgrenzen könnte. Die gesamte Anmeldung beschreibt lediglich Epoxidhydrolaseaktivitäten entweder in unfraktionierten Bakterienzellen oder in unaufgearbeiteten Fraktionen solcher Bakterienzellen, wobei diese Fraktionen angereichert sind mit der Epoxidhydrolaseaktivität. Es steht nicht einmal fest, ob besagte Aktivität auf ein oder mehrere Enzyme zurückzuführen ist. In Beispiel 4 unternimmt die Anmelderin eine partielle Reinigung dieser enzymatischen Aktivität, aber ohne das gereinigte Enzym bereitzustellen.

Dem Fachmann fehlt damit jede Anleitung, um das beanspruchte Produkt ohne erheblichen experimentellen Aufwand zu erhalten.

Die mangelnde Offenbarung erstreckt sich auch auf die Verfahrensansprüche 5 und 6 sowie 11-16, die sich auf die Epoxidhydrolase der Ansprüche 1-3 beziehen.



## Patentansprüche

1. Epoxidhydrolase (E.C. 3.3.2.3) aus einem Mikroorganismus der  
5 Gattung *Streptomyces* sp.
2. Epoxidhydrolase nach Anspruch 1, gekennzeichnet durch wenigstens eine der folgenden Eigenschaften:
  - 10 a) hydrolytische Epoxidspaltung eines Styroloxids, und wenigstens einer weiteren Verbindung ausgewählt unter 3-Phenyl-ethylglycidaten, n-Hexan-1,2-oxiden, n-Decan-1,2-oxiden und Indenoxiden;
  - 15 b) Umsetzung eines Racemats von Styroloxid mit einer Enantioselektivität  $E \geq 2$  zu (S)-Phenyl-1,2-ethanol.
3. Epoxidhydrolase isoliert aus Bakterien der Gattung *Streptomyces* sp., insbesondere aus der Art *S. griseus*, *S. thermovulgaris*, *S. antibioticus*, *S. arenae* und *S. fradiae*, vorzugsweise  
20 aus den Stämmen *Streptomyces griseus* (DSM 40236 und DSM 13447), *Streptomyces thermovulgaris* (DSM 40444 und DSM 13448) *Streptomyces antibioticus* Tü 4 (DSM 12925), *Streptomyces arenae* Tü495 (DSM 40737 und DSM 12134) oder *Streptomyces fradiae* Tü 27 (DSM 12131).  
25
4. *Streptomyces antibioticus* Tü 4 hinterlegt bei der DSMZ unter der Hinterlegungsnummer DSM 12925.
- 30 5. Verfahren zur Trennung von Epoxid-Enantiomerengemischen, dadurch gekennzeichnet, daß man
  - a) ein Epoxid-Enantiomerengemisch, welches ein Epoxidhydrolase-Substrat umfasst, mit einer Epoxidhydrolase gemäß  
35 einem der Ansprüche 1 bis 3, einem Mikroorganismus der Gattung *Streptomyces* sp., einem Epoxidhydrolase-haltigen Homogenat davon oder einer Fraktion dieses Homogenates inkubiert;
  - 40 b) das Enantiomerengemisch, vorzugsweise bis zur Einstellung des Reaktionsgleichgewichtes, umsetzt; und
  - c) das Reaktionsgemisch auftrennt.

45



## 16

6. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß man ein Enantiomerengemisch eines Epoxids umsetzt, das ausgewählt ist unter Styroloxiden, 3-Phenylglycidaten, Hexan-1,2-oxiden, Decan-1,2-oxiden und Indenoxiden.
- 5 7. Nachweisverfahren für Epoxidhydrolase, wobei man
- 10 a) einen Analyten, in welchen man Epoxidhydrolaseaktivität vermutet, mit einem epoxidhaltigen Substrat für die Epoxidhydrolase unter Reaktionsbedingungen inkubiert, wobei der Analyt ein Bakterium aus der Gattung Streptomyces sp., ein Homogenat davon oder eine Fraktion dieses Homogenates ist;
- 15 b) mit nicht umgesetztem Epoxid in Anwesenheit von 4-Nitrobenzylpyridin (NBP) eine Farbreaktion durchführt; und
- 20 c) den Ansatz aus Schritt b) auf Abnahme der Farbstoffkonzentration, relativ zu einem Epoxidhydrolase-freien Kontrollansatz analysiert.
8. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß man die relative Abnahme der Farbstoffkonzentration quantitativ bestimmt und daraus die Epoxidhydrolaseaktivität im Analyten
- 25 ermittelt.
9. Verfahren nach einem der Ansprüche 7 und 8, dadurch gekennzeichnet, daß das epoxidhaltige Substrat Styroloxid, 3-Phenylglycidat, Hexan-1,2-oxid und/oder Indenoxid in enantiomerenreiner Form oder ein Enantiomerengemisch davon ist.
- 30 10. Screening-Verfahren zum Nachweis von Mikroorganismen mit Epoxidhydrolaseaktivität und/oder mit der Befähigung zur enantioselektiven Hydrolyse von Epoxiden, umfassend ein Nachweisverfahren nach einem der Ansprüche 7 bis 9.
- 35 11. Verwendung einer Epoxidhydrolase gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3, eines Mikroorganismus der Gattung Streptomyces sp., eines Epoxidhydrolase-haltigen Homogenates davon oder einer Fraktion dieses Homogenates zur enantioselektiven Hydrolyse von Epoxiden.
- 40 12. Verwendung einer Epoxidhydrolase gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3, eines Mikroorganismus der Gattung Streptomyces sp., eines Epoxidhydrolase-haltigen Homogenates davon oder einer
- 45



Fraktion dieses Homogenates zur enantioselektiven Herstellung von Hydroxiden aus den korrespondierenden Epoxiden.

13. Verfahren zur Gewinnung von Epoxidhydrolasen (E.C. 3.3.2.3),  
5 dadurch gekennzeichnet, daß man
- a) aus einer Kultur eines Mikroorganismus der Gattung Streptomyces sp. ein Zellhomogenat herstellt;
  - 10 b) das Homogenat fraktioniert, wobei man die erhaltenen Fraktionen auf Epoxidhydrolase-Aktivität, gegebenenfalls unter Anwendung eines Nachweisverfahrens gemäß einem der Ansprüche 7 bis 9, testet; und
  - 15 c) Fraktionen mit Epoxidhydrolase-Aktivität vereinigt und gegebenenfalls weiter fraktioniert.
14. Verwendung eines Mikroorganismus der Gattung Streptomyces sp. zur Gewinnung einer Epoxidhydrolase (E.C. 3.3.2.3).  
20
15. Verwendung nach Anspruch 14, wobei die Epoxidhydrolase durch wenigstens eine der folgenden Eigenschaften gekennzeichnet ist:
- 25 a) hydrolytische Epoxidspaltung eines Styroloxids, und wenigstens einer weiteren Verbindung ausgewählt unter 3-Phenyl-ethylglycidaten, n-Hexan-1,2-oxiden, n-Decan-1,2-oxiden und Indenoxiden;
  - 30 b) Umsetzung eines Racemats von Styroloxid mit einer Enantioeselektivität  $E \geq 2$  zu (S)-Phenyl-1,2-ethanol.
16. Verwendung nach Anspruch 14 oder 15, wobei die Epoxidhydrolase aus Bakterien der Gattung Streptomyces sp., insbesondere  
35 aus der Art S. griseus, S. thermovulgaris, S. antibioticus, S. arenae und S. fradiae, vorzugsweise aus den Stämmen Streptomyces griseus (DSM 40236 und DSM 13447), Streptomyces thermovulgaris (DSM 40444 und DSM 13448) Streptomyces antibioticus Tü 4 (DSM 12925), Streptomyces arenae Tü495 (DSM 40737 und DSM 12134) oder Streptomyces fradiae Tü 27 (DSM 12131),  
40 gewonnen wird.
- 45





Translation

5000  
PATENT COOPERATION TREATY

5

# PCT

## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

10/031702

Applicant's or agent's file reference M/40065-PCT	<b>FOR FURTHER ACTION</b> See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/EP00/07211	International filing date (day/month/year) 26 July 2000 (26.07.00)	Priority date (day/month/year) 27 July 1999 (27.07.99)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12N 15/31		
Applicant BASF AKTIENGESELLSCHAFT		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.

2. This REPORT consists of a total of 6 sheets, including this cover sheet.

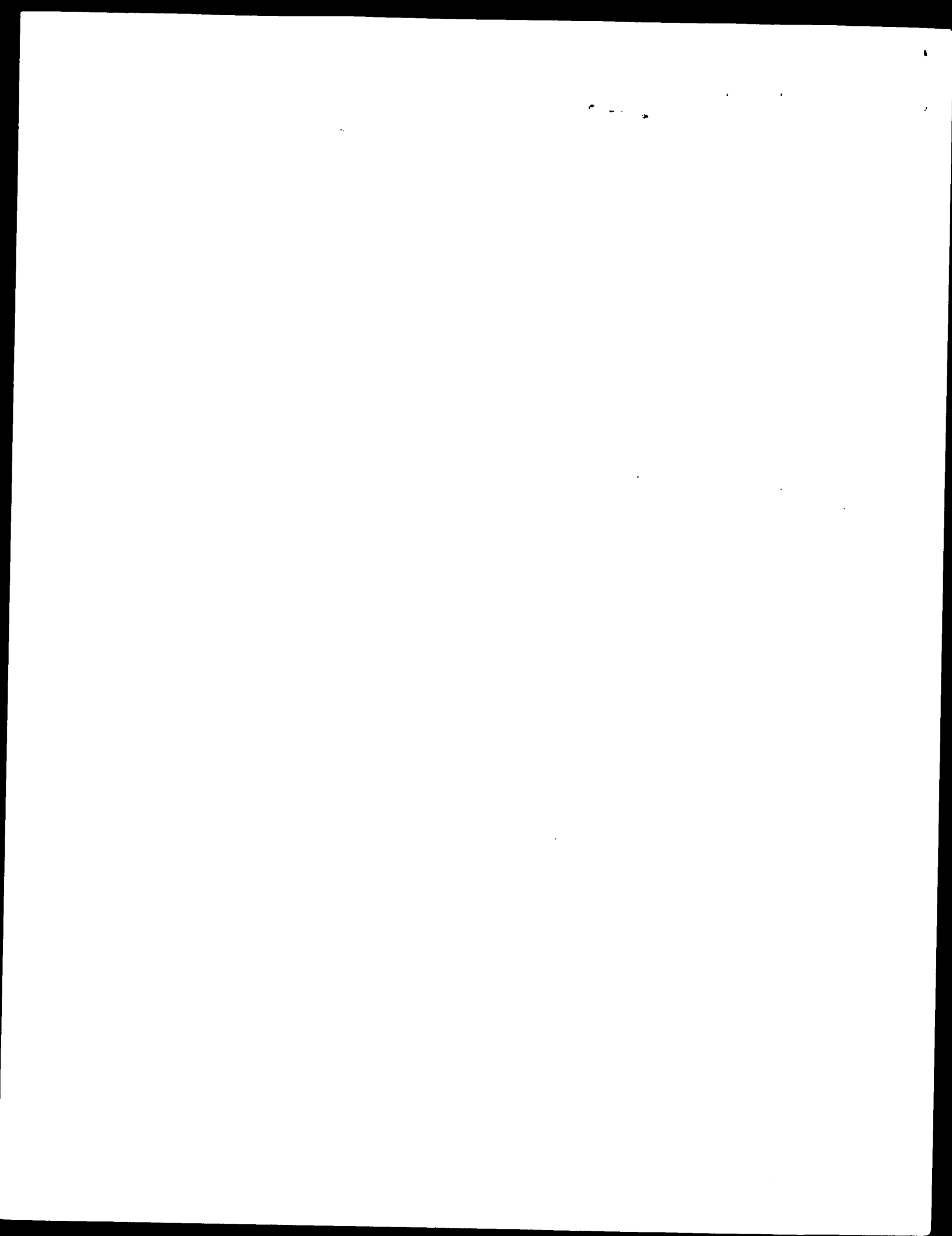
☒ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of 3 sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I ☒ Basis of the report
- II ☐ Priority
- III ☐ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☐ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI ☐ Certain documents cited
- VII ☐ Certain defects in the international application
- VIII ☒ Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 21 February 2001 (21.02.01)	Date of completion of this report 07 November 2001 (07.11.2001)
Name and mailing address of the IPEA/EP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.



# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP00/07211

## I. Basis of the report

### 1. With regard to the elements of the international application:\*

- ☐ the international application as originally filed
- ☒ the description:  
 pages 1-14, as originally filed  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☒ the claims:  
 pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
 pages \_\_\_\_\_, as amended (together with any statement under Article 19  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
 pages 1-16, filed with the letter of 15 October 2001 (15.10.2001)
- ☒ the drawings:  
 pages 1/3-3/3, as originally filed  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☐ the sequence listing part of the description:  
 pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_

### 2. With regard to the language, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language \_\_\_\_\_ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

### 3. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☐ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

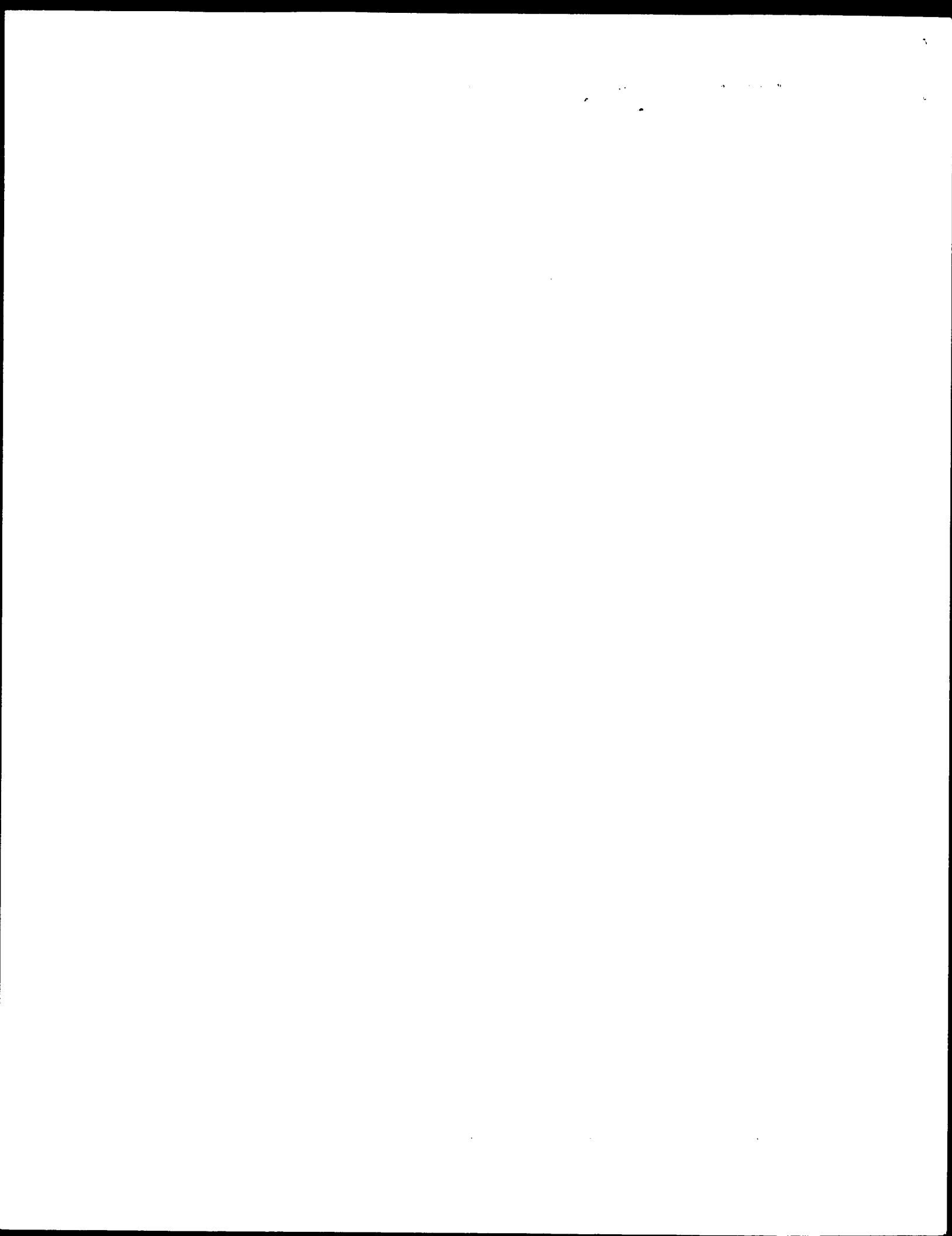
### 4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages \_\_\_\_\_
- ☐ the claims, Nos. \_\_\_\_\_
- ☐ the drawings, sheets/fig \_\_\_\_\_

### 5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).\*\*

\* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

\*\* Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.



# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP 00/07211

## I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of *(Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.)*:

The claimed priority appears to be valid.

Therefore the new claim set meets the requirements of PCT  
Article 34(2)(b).



# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP 00/07211

## V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

### 1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-3, 5-16	YES
	Claims	4	NO
Inventive step (IS)	Claims		YES
	Claims	1-16	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-16	YES
	Claims		NO

### 2. Citations and explanations

The addition of the feature "*Streptomyces*" to independent Claim 7 redresses the objection relating to a lack of unity of invention.

This report makes reference to the following documents:

D1: LUTZ-WAHL SABINE ET AL, APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, Vol. 64, No. 10, October 1998, pages 3878-3881

D2: ZOCHER FRANK ET AL, ANALYTICA CHIMICA ACTA, Vol. 391, No. 3, 4 June 1999 (1999-06-04), pages 345-351

D3: RINK R ET AL, JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, Vol. 272, No. 23, 6 June 1997, pages 14650-14657.

#### 1. Novelty (Non-fulfillment of (PCT Article 33(2)) Claim 4 lacks novelty

D1 describes the *Streptomyces antibioticus* strain Tü4, which the applicant has deposited with the DSMZ under DSM number 12925. According to D1, this strain is part of the collection of the Institute for Microbiology and Biotechnology at the University of Tübingen (D1, abstract, page 3878, right-hand column, first paragraph). Thus said strain is disclosed and available to the public, since it corresponds to scientific practice to make published

1944

1945

1946

1947



material available to others. The instructions for authors in "Applied and Environmental Microbiology", the scientific journal which published D1, clearly stipulate that newly described biological material, including strains of bacteria, have to be either deposited by the authors in a national collection or made available to members of the scientific community. Also, the applicant must demonstrate for the regional phase that the strain Tü 4 (DSM 12925) was not available to the scientific community.

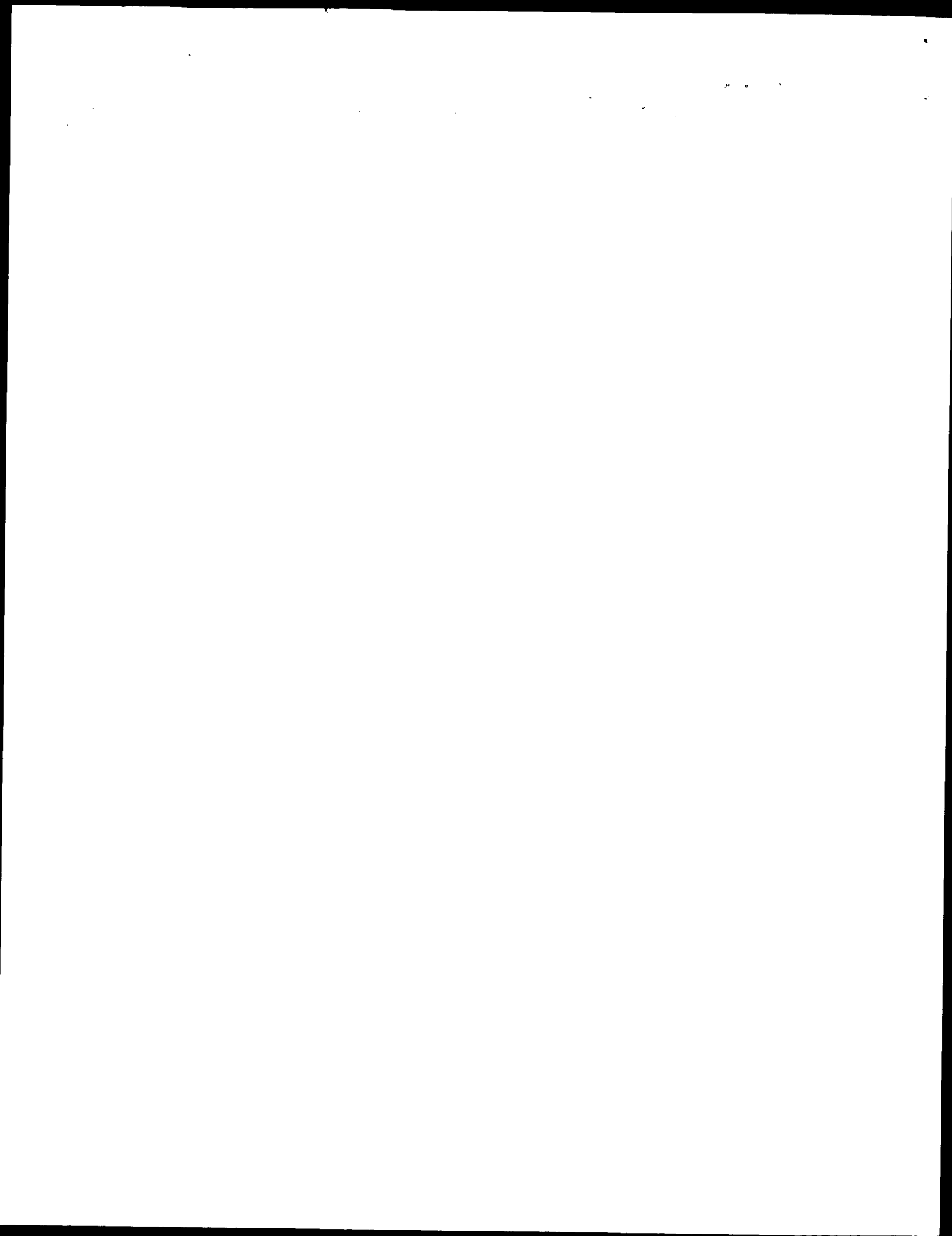
**2. Inventive step: Claims 5-16 lack an inventive step**

**2.1 Claims 1-3, 5, 6, 11-13 and 14-16**

These claims relate to an epoxide hydrolase, a method for separating epoxide enantiomer mixtures or for enantio-selective hydrolysis of epoxides using, *inter alia*, an epoxide hydrolase of *Streptomyces*, and finally, to the use of microorganisms of the genus *Streptomyces* for producing epoxide hydrolases. However, said epoxide hydrolases are not disclosed (see Box VIII, point 1). For this reason, Claims 5, 6, and 11-16 lack an inventive step.

**2.2 Claims 7-10**

In light of the relevant prior art, which is represented by D2 and D3, the problem to be solved by Claim 7 is that of providing a method for detecting epoxide hydrolases of *Streptomyces*. The solution to the problem in question consists in using the NBP-based colorimetric detection method on *Streptomyces* lysates or cells, or on fractions of the lysate. This solution is trivial, since a person skilled in the art would immediately apply this to streptomycetes. This does not mean that a person



**INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT**

International application No.

PCT/EP 00/07211

skilled in the art would thereby carry out an ex-post facto analysis. Rather, a person skilled in the art naturally has to know the problem to be solved, as was just indicated.

Therefore Claim 10 does not correspond to PCT Article 33(3).



# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.  
PCT/EP 00/07211

## VIII. Certain observations on the international application

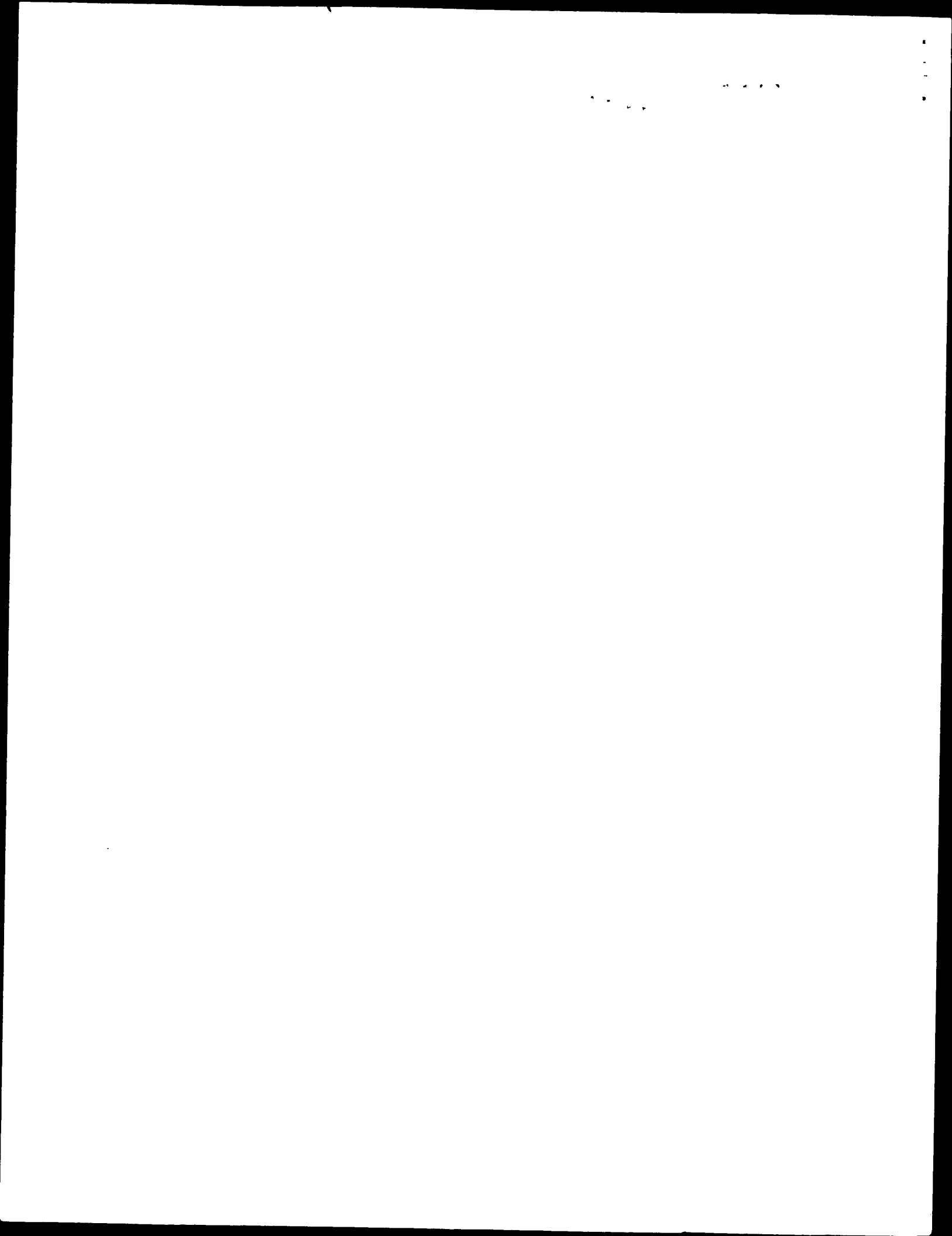
The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

### **Claims 1-3, 5, 6, and 13-15 do not satisfy PCT Article 5.**

These claims relate to an epoxide hydrolase from a microorganism of the genus *Streptomyces*. However, the application does not disclose how said product can be obtained. Also, Claims 1-3 lack novelty, because they contain no technical feature that could delimit them over the epoxide hydrolases already known. The entire application describes only epoxide hydrolase activities, either in unfractionated bacteria cells or in non-transformed fractions of such bacteria cells, these fractions being enriched by the epoxide hydrolase activity. It is not even clearly indicated whether said activity can be attributed to one or a plurality of enzymes. In Example 4, the applicant undertakes a partial purification of this enzymatic activity, but without providing the purified enzyme.

Thus a person skilled in the art lacks any and all instruction on how to obtain the claimed product without considerable experimental cost.

The insufficient disclosure extends also to method Claims 5, 6 and 11-16, which relate to the epoxide hydrolase of Claims 1-3.



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/EP 00/07211

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
IPC 7 C12N15/31 C12N9/14 C12P41/00 C12Q1/34

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
IPC 7 C12N C12P C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	LUTZ-WAHL SABINE ET AL: "Stereo- and regioselective hydroxylation of alpha-ionone by Streptomyces strains." APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, vol. 64, no. 10, October 1998 (1998-10), pages 3878-3881, XP000946739 ISSN: 0099-2240 the whole document	4
X	ZOCHER FRANK ET AL: "A colorimetric assay suitable for screening epoxide hydrolase activity." ANALYTICA CHIMICA ACTA, vol. 391, no. 3, 4 June 1999 (1999-06-04), pages 345-351, XP000946717 ISSN: 0003-2670 the whole document	7-12

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

\* Special categories of cited documents:

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- \*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- \*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- \*a\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

3 October 2000

Date of mailing of the international search report

27. 10. 00

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Smalt, R





# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internat'l Application No  
PCT/EP 00/07211

**C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>WEIJERS CAREL A G M ET AL: "Epoxide hydrolases from yeast and other sources: versatile tools in biocatalysis." JOURNAL OF MOLECULAR CATALYSIS B ENZYMATIC, vol. 6, no. 3, 11 March 1998 (1998-03-11), pages 199-214, XP000946716 ISSN: 1381-1177 the whole document</p>	
P,X	<p style="text-align: center;">---</p> <p>ZOCHER F ET AL: "Epoxide hydrolase activity of Streptomyces strains" JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY, NL, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, vol. 77, no. 2-3, February 2000 (2000-02), pages 287-292, XP004185827 ISSN: 0168-1656 the whole document</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-15



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/EP 00/07211

### FURTHER INFORMATION PCT/ISA/210

The International Searching Authority found that this International Application contains several inventions or groups of inventions, as follows:

1. Claims Nos.: 1-6, 13, 14 completely, and claim partially

Epoxide hydrolases from a microorganism of the genus *Streptomyces*, the use thereof for the separation of epoxide-enantiomer mixtures, the strain T04 of *Streptomyces antibioticus* from which a hydrolase can be isolated, and a method for obtaining epoxide hydrolases from a culture of a microorganism of the genus *Streptomyces*.

2. Claims Nos.: 7-12 completely, and claim 15 partially

Method for screening epoxide hydrolase according to which an epoxide-containing substrate is incubated together with an analyte and the non-reacted epoxide is detected with 4-nitrobenzyl pyridine (NBP) by color reaction. Use of said method for detecting microorganisms that have epoxide hydrolase activity, and method for obtaining epoxide hydrolases from a *Streptomyces* culture using said screening method.



## PATENT COOPERATION TREATY

PCT

## NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Commissioner  
 US Department of Commerce  
 United States Patent and Trademark  
 Office, PCT  
 2011 South Clark Place Room  
 CP2/5C24  
 Arlington, VA 22202  
 ETATS-UNIS D'AMERIQUE  
 in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year) 23 April 2001 (23.04.01)	
International application No. PCT/EP00/07211	Applicant's or agent's file reference inc0065-PCT
International filing date (day/month/year) 26 July 2000 (26.07.00)	Priority date (day/month/year) 27 July 1999 (27.07.99)
Applicant ZOCHER, Frank et al	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:  
 21 February 2001 (21.02.01)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:  
 \_\_\_\_\_

2. The election ☒ was  
☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Authorized officer A. Karkachi Telephone No.: (41-22) 338.83.38
---	---

